



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

ESTUDIO GENÉTICO-MOLECULAR DE HIPOACUSIAS  
HEREDITARIAS NO SINDRÓMICAS CAUSADAS POR  
MUTACIONES EN GENES DE PROTEÍNAS DEL  
CITOESQUELETO

TESIS DOCTORAL

LUCIANA SANTOS SERRAO DE CASTRO  
Madrid, 2012



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

ESTUDIO GENÉTICO-MOLECULAR DE HIPOACUSIAS  
HEREDITARIAS NO SINDRÓMICAS CAUSADAS POR  
MUTACIONES EN GENES DE PROTEÍNAS DEL  
CITOESQUELETO

LUCIANA SANTOS SERRAO DE CASTRO  
Madrid, 2012

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

ESTUDIO GENÉTICO-MOLECULAR DE HIPOACUSIAS  
HEREDITARIAS NO SINDRÓMICAS CAUSADAS POR  
MUTACIONES EN GENES DE PROTEÍNAS DEL  
CITOESQUELETO

Memoria que, para optar al título de doctor,  
presenta **Luciana Santos Serrao de Castro**,  
licenciada en Biología

Director de Tesis  
Dr. Ignacio del Castillo Fernández del Pino  
Unidad de Genética Molecular  
Hospital Ramón y Cajal

Unidad de Genética Molecular  
Hospital Ramón y Cajal  
Madrid, 2012

Don Ignacio del Castillo Fernández del Pino, Doctor en Ciencias Biológicas,  
Investigador de la Unidad de Genética Molecular del Hospital Ramón y Cajal de Madrid

**CERTIFICA,**

Que Doña Luciana Santos Serrao de Castro ha realizado bajo su dirección el Trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título “Estudio genético-molecular de hipoacusias hereditarias no sindrómicas causadas por mutaciones en genes de proteínas del citoesqueleto”.

Revisado el presente trabajo, expreso mi conformidad para la presentación del mismo, por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometida a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctor.

En Madrid, a 10 de octubre de 2012.

Fdo: Dr. Ignacio del Castillo Fernández del Pino  
Director de Tesis  
Unidad de Genética Molecular  
Hospital Ramón y Cajal, Madrid

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Ignacio del Castillo, director de esta tesis, gracias por todo lo que he aprendido estando en el grupo.

Al Dr. Felipe Moreno, por haberme aceptado en la Unidad de Genética Molecular.

Al Hospital Universitario Ramón y Cajal y a su Fundación para la Investigación Biomédica (FIBIO).

Al Ministerio de Economía y Competitividad (proyecto SAF2008-03216) por la financiación para el desarrollo del trabajo.

Al Programa Alβan "Becas de Alto Nivel para América Latina" por la beca que me han concedido para la realización de esta tesis.

A la Dra. Edi Lúcia Sartorato, por animarme a buscar un doctorado fuera de Brasil y por haber hecho posible el contacto con la Unidad de Genética Molecular.

A los Doctores: Francisco Mauro Salzano y Sidney Emanuel Batista dos Santos por el gran apoyo a mi candidatura a la beca Alβan.

A la Doctora Isabel Varela, mi tutora en la Universidad Autónoma de Madrid.

Al Dr. Francisco del Castillo, por estar siempre disponible para ayudarme cuando lo he necesitado.

A Montserrat Rodríguez, por toda su ayuda en innumerables situaciones, principalmente cuando llegué a Madrid.

A mis compañeras de doctorado: Marta Gandía y Laura Ruiz, por todos los momentos compartidos en estos cinco años.

A María Domínguez por su ayuda y por las correcciones gramaticales de la tesis.

A Elena Gomez por estar siempre dispuesta a ayudarme.

A Lolo, por la ayuda con la secuenciación, genotipado y DHPLC.

A Gema Garrido, por la ayuda con el DHPLC y por su amistad.

A Romina Charaf, por su gran amistad y por haber compartido conmigo momentos muy felices en estos años de tesis.

A todos mis compañeros de la Unidad de Genética Molecular, gracias por todo.

## RESUMEN

La hipoacusia es el trastorno neurosensorial más frecuente en humanos, con una elevada heterogeneidad a todos los niveles. Solamente para las hipoacusias no sindrómicas se han descrito 123 loci y 64 genes. Esta heterogeneidad dificulta el diagnóstico molecular, cuya mejora requiere incrementar nuestro conocimiento sobre la epidemiología genética para saber sobre qué genes conviene concentrar la búsqueda de mutaciones. Este trabajo se centró en el análisis de cinco de los genes implicados en hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas (HNSAR): *MYO15A*, *MYO3A*, *WHRN*, *MYO6* y *PTPRQ*, responsables de las hipoacusias de los tipos DFNB3, DFNB30, DFNB31, DFNB37 y DFNB84, respectivamente. Se investigaron 80 casos familiares de HNSAR mediante análisis de haplotipos para marcadores microsatélites próximos a cada gen y, en caso de compatibilidad con ligamiento, se secuenciaron todos los exones y fronteras exón/intrón del gen en un probando de la familia. En tres de los genes (*MYO3A*, *WHRN* y *MYO6*) no encontramos mutaciones patogénicas. En el gen *PTPRQ*, hemos encontrado una nueva mutación en homocigosis en una familia española de origen gitano. En el gen *MYO15A* encontramos mutaciones patogénicas en cinco casos familiares. Extendimos el estudio de este gen a 80 casos esporádicos de hipoacusia no sindrómica, detectando mutaciones mediante análisis de heterodúplex de ADN en DHPLC, lo que permitió elucidar cuatro casos. En conjunto, hemos descrito 14 mutaciones nuevas en el gen, lo que representa un notorio incremento del conocimiento sobre el espectro mutacional de *MYO15A*. Nuestros resultados indican que la contribución de los genes *MYO3A*, *WHRN*, *MYO6* y *PTPRQ* al conjunto de las HNSAR es muy baja (1% o inferior). Por el contrario, las mutaciones en el gen *MYO15A* dan cuenta del 5% de los casos estudiados, lo que sitúa a este gen entre aquellos sobre los que hay concentrar el diagnóstico molecular con carácter asistencial en la población española.

## SUMMARY

Hearing impairment is the most frequent sensorineural disorder in humans, and it is highly heterogeneous at all levels. To date, 123 loci and 64 genes have been reported only for non-syndromic hearing impairment. This heterogeneity hampers the molecular diagnosis, whose improvement requires to increase our current knowledge on genetic epidemiology, in order to identify the genes to which mutation detection should be directed. This work was focused on the analysis of five of the genes involved in autosomal recessive non-syndromic hearing impairment (ARNSHI): *MYO15A*, *MYO3A*, *WHRN*, *MYO6* and *PTPRQ*, responsible for the DFNB3, DFNB30, DFNB31, DFNB37 and DFNB84 subtypes of ARNSHI, respectively. Eighty familial cases of ARNSHI were investigated through haplotype analysis for microsatellite markers close to each gene and, in case of compatibility with linkage, all exons and exon/intron boundaries of the gene were sequenced in one proband from the family. In three of the genes (*MYO3A*, *WHRN* and *MYO6*) we did not find any pathogenic mutation. In the *PTPRQ* gene, we found a novel mutation in the homozygous state in a Spanish Gypsy family. In *MYO15A*, we found pathogenic mutations in five familial cases. Subsequently, the study of this gene was extended to 80 sporadic cases of non-syndromic hearing impairment, through mutation detection by DNA heteroduplex analysis in DHPLC, which elucidated four additional cases. In total, we report here 14 novel mutations, what represents a remarkable increase of the knowledge on the mutational spectrum of *MYO15A*. Our results indicate that the contribution of *MYO3A*, *WHRN*, *MYO6* and *PTPRQ* to ARNSHI is very small (1% or lower). On the contrary, mutations in *MYO15A* account for 5% of the cases that were investigated. These results place this gene among those that should be screened to provide a routine molecular diagnosis of ARNSHI in the Spanish population.

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	IV
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
1. Anatomía y fisiología del sistema auditivo	1
2. Aspectos generales de las hipoacusias	5
3. Epidemiología genética	6
4. Locus DFNB31: gen de la Whirlina	7
5. Locus DFNB84: gen <i>PTPRQ</i>	8
6. La superfamilia de miosinas	10
6.1. Locus DFNB3: gen de la Miosina XVA	12
6.2. Locus DFNB30: gen de la miosina IIIA	14
6.3. Locus DFNB37: gen de la miosina VI	15
<b>OBJETIVOS</b>	17
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	18
1. Pacientes y métodos generales	18
1.1 Pacientes	18
1.2 Extracción de ADN	18
1.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	18
1.4 Secuenciación del ADN	19
1.5 Genotipado de marcadores microsatélites - Análisis de haplotipos	19
1.6 Ensayos de minisequenciación (SNaPshot) para estudios de controles	20
1.7 Análisis de heterodúplex de ADN en dHPLC	20
2. Locus DFNB30 (gen <i>MYO3A</i> )	21
2.1 Análisis de haplotipos	21
2.2 Secuenciación del gen <i>MYO3A</i>	21
3. Locus DFNB31 (gen <i>WHRN</i> )	22
3.1 Análisis de haplotipos	22
3.2 Secuenciación del gen <i>WHRN</i>	22
4. Locus DFNB37 (gen <i>MYO6</i> )	23
4.1 Análisis de haplotipos	23
4.2 Secuenciación del gen <i>MYO6</i>	23
5. Locus DFNB84 (gen <i>PTPRQ</i> )	24
5.1 Análisis de haplotipos	24
5.2 Secuenciación del gen <i>PTPRQ</i>	25

6. Locus DFNB3 (gen <i>MYO15A</i> )	26
6.1 Análisis de haplotipos	26
6.2 Secuenciación del gen <i>MYO15A</i>	26
7. Análisis de heterodúplex de ADN en dHPLC en el gen <i>MYO15A</i> en casos esporádicos	28
8. Evaluación de las variantes de secuencia encontradas en <i>MYO15A</i> por ensayos de minisequenciación ( <i>SNaPshot</i> ) en individuos control con audición normal	29
<b>RESULTADOS</b>	30
1. Locus DFNB30 (gen <i>MYO3A</i> )	30
2. Locus DFNB31 (gen <i>WHRN</i> )	31
3. Locus DFNB37 (gen <i>MYO6</i> )	31
4. Locus <i>DFNB84</i> (gen <i>PTPRQ</i> )	32
5. Locus DFNB3 (gen <i>MYO15A</i> )	35
5.1 Estudio de casos familiares españoles	35
5.2 Estudio de casos esporádicos españoles	43
5.3 Familia brasileña	49
<b>Discusión</b>	52
1. Hipoacusia no sindrómica de tipo DFNB30	53
2. Hipoacusia no sindrómica de tipo DFNB31	54
3. Hipoacusia no sindrómica de tipo DFNB37	55
4. Hipoacusia no sindrómica de tipo DFNB84	56
5. Hipoacusia no sindrómica de tipo DFNB3	57
<b>CONCLUSIONES</b>	58
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	59
<b>ARTÍCULOS</b>	67



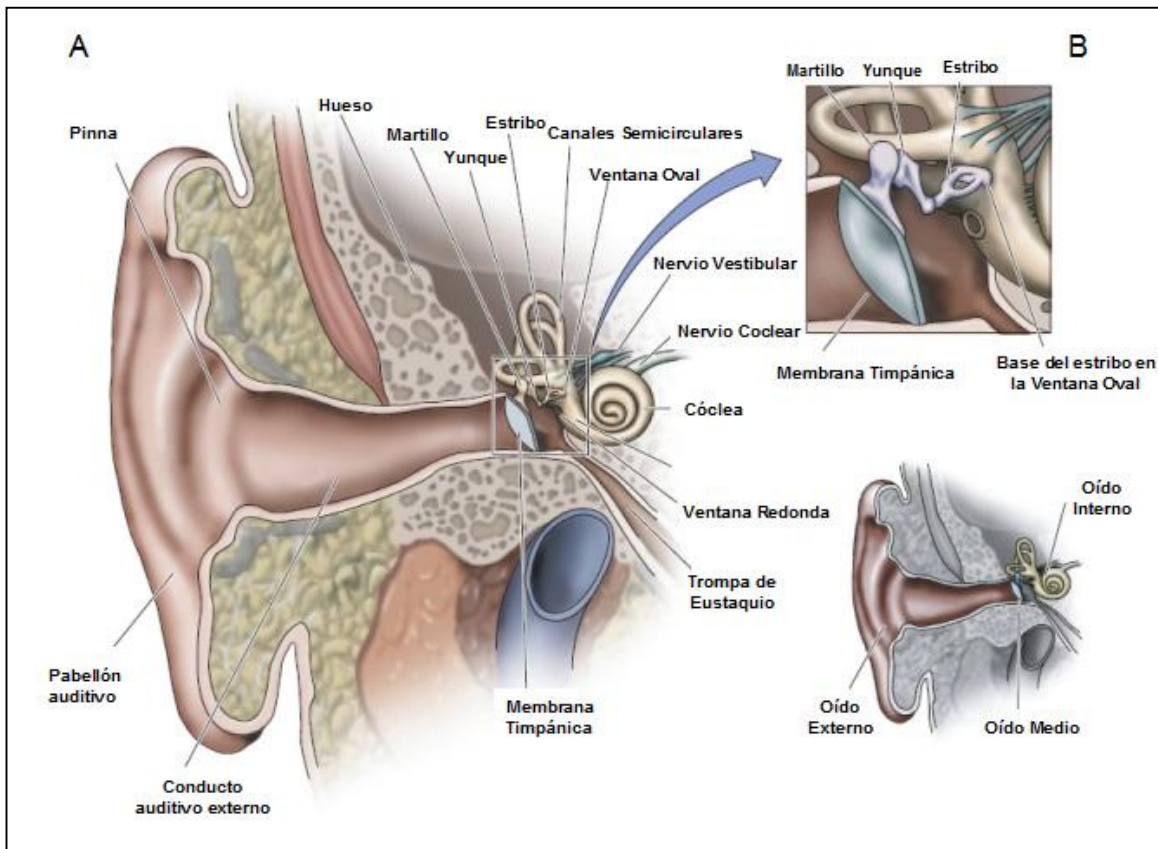
## ABREVIATURAS

Aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
cM	centimorgan
dB	Decibelios
DFNA	<i>Locus</i> de hipoacusia no sindrómica autosómica dominante
DFNB	<i>Locus</i> de hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva
DFNX	<i>Locus</i> de hipoacusia no sindrómica ligada al cromosoma X
DFNY	<i>Locus</i> de hipoacusia no sindrómica ligada al cromosoma Y
DHPLC	<i>Denaturing High-Performance Liquid Chromatography</i>
ddNTP	Didesoxirribonucleótido trifosfato
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
EDTA	Etilén diamino tetraacético
KDa	KiloDalton
kb	kilobase
MIM	<i>Mendelian Inheritance in Man</i>
μl	microlitros
mRNA	ARN mensajero
mM	micromolar
Mt	Alelo mutante
ng	nanogramos
nm	nanometros
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
pb	Par de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pmol	Picomol
Wt	Alelo silvestre
WHO	<i>World Health Organization</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
U	Unidad
UTR	Región no traducida ( <i>UnTranslated Region</i> )

## *INTRODUCCIÓN*

## 1. Anatomía y fisiología del sistema auditivo

El oído de los mamíferos consta de tres partes: el oído externo, el oído medio y el oído interno (Figura 1). El oído externo está formado por el pabellón auditivo y el conducto auditivo externo. El pabellón auditivo es una estructura flexible, de cartílago elástico y revestido por piel. El conducto auditivo externo es un canal cartilaginoso en su tercio externo y óseo en los dos tercios internos (hueso temporal). El extremo exterior del conducto auditivo externo está abierto, mientras que su extremo interior está cerrado por la membrana del tímpano, que lo separa del oído medio (Figura 1A). El pabellón tiene como función localizar espacialmente el sonido, mientras que el conducto auditivo externo protege de manera pasiva las estructuras más profundas y conduce la vibración sonora hasta la membrana del tímpano. El oído medio es una cavidad aireada en el hueso temporal, también llamada cavidad timpánica, y consta de una cadena de tres osículos: martillo, yunque y estribo, unidos entre sí de forma articulada (Figura 1B). Uno de los extremos del martillo se encuentra adherido al tímpano, mientras que la base del estribo está unida mediante un anillo flexible a las paredes de la ventana oval, orificio que constituye la vía de entrada del sonido al oído interno.



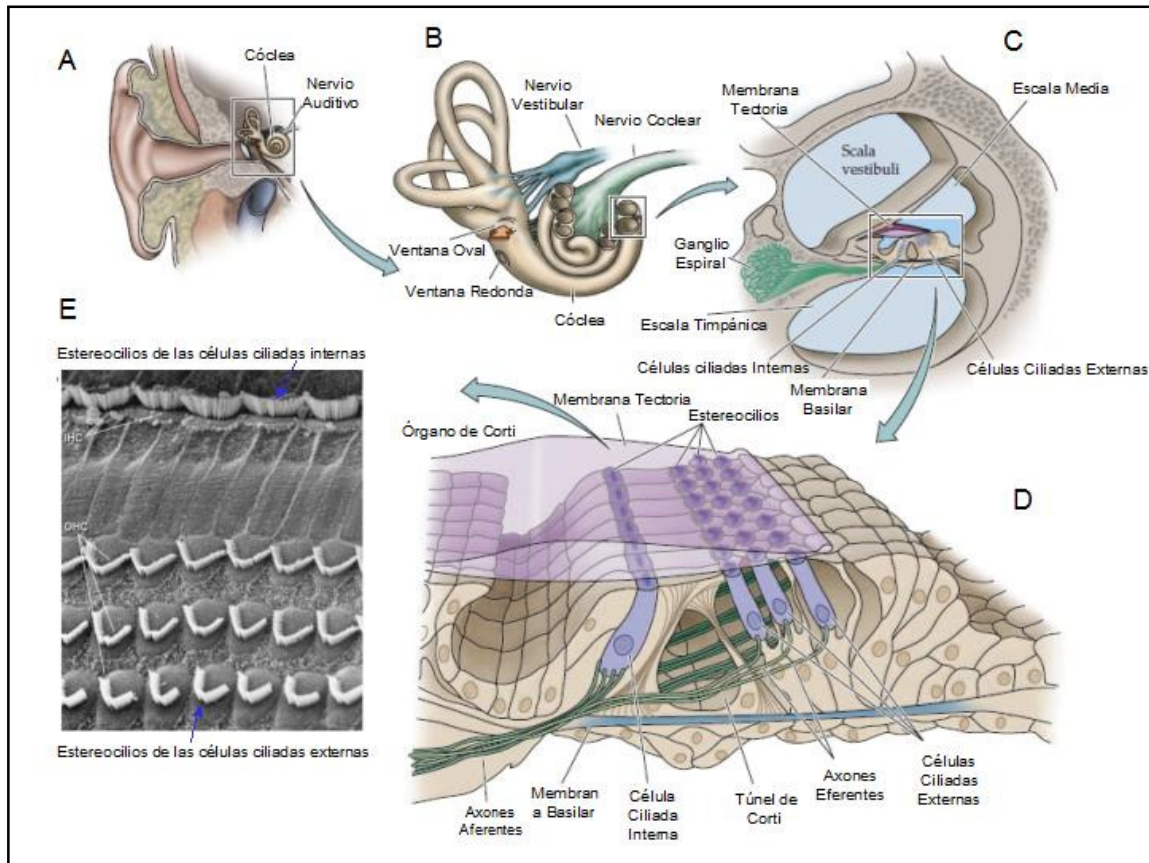
**Figura. 1:** Esquema del oído (adaptado de Purves et al., 2001).

La función básica del oído medio es transmitir la energía sonora del medio aéreo (oído externo) al medio líquido (oído interno). El oído interno, que está contenido en la porción pétrea del hueso temporal, consiste en un laberinto óseo que a su vez contiene los conductos del laberinto membranoso. Dentro de éstos se encuentra el neuroepitelio.

El laberinto presenta una parte anterior, la cóclea, relacionada con la audición, y una parte posterior relacionada con el equilibrio y constituida por el vestíbulo y por los canales semicirculares (Figura 2B). La cóclea es una estructura helicoidal. El eje central, el modiollo, presenta una expansión perpendicular, la lámina espiral, desde la base hasta el ápice del modiollo. En torno a la lámina espiral se encuentra el canal coclear, que tiene inicio en la parte anterior del vestíbulo. La lámina divide de manera incompleta el canal en dos porciones: una superior, la escala vestibular, y otra inferior, la escala timpánica (Figura 2C). Ambas contienen perilinfa, que deriva del líquido cefalorraquídeo que penetra en el laberinto por el acueducto coclear. Estas dos escalas se unen en el helicotrema, que está en el ápice de la cóclea.

Desde la lámina espiral aparecen dos membranas, una como continuación de la lámina, completando la separación entre las dos escalas, la membrana basilar, y otra con un ángulo de aproximadamente 30° en relación a la primera, la membrana de Reissner. Las dos membranas delimitan un espacio triangular, la escala media. El tercer lado del triángulo lo constituye el ligamento espiral, en el que se encuentra una estructura ricamente vascularizada y de gran actividad metabólica, la estría vascular. La estría vascular produce el líquido que llena la escala media, la endolinfa, que tiene características iónicas similares a los líquidos intracelulares (alta concentración de  $K^+$  y baja de  $Na^+$ ).

La Escala Media contiene el órgano de Corti, que es el epitelio sensorial del sistema auditivo (Figura 2D). El órgano de Corti descansa sobre la membrana basilar. Las células sensoriales especializadas, llamadas células ciliadas, presentan una disposición altamente organizada: una fila interior (células ciliadas internas) y tres filas exteriores (células ciliadas externas) (Figura 2E). Hay aproximadamente 16.000 células ciliadas en cada cóclea. La parte apical de las células ciliadas contiene microvellosidades especializadas, ricas en actina, llamadas estereocilios.

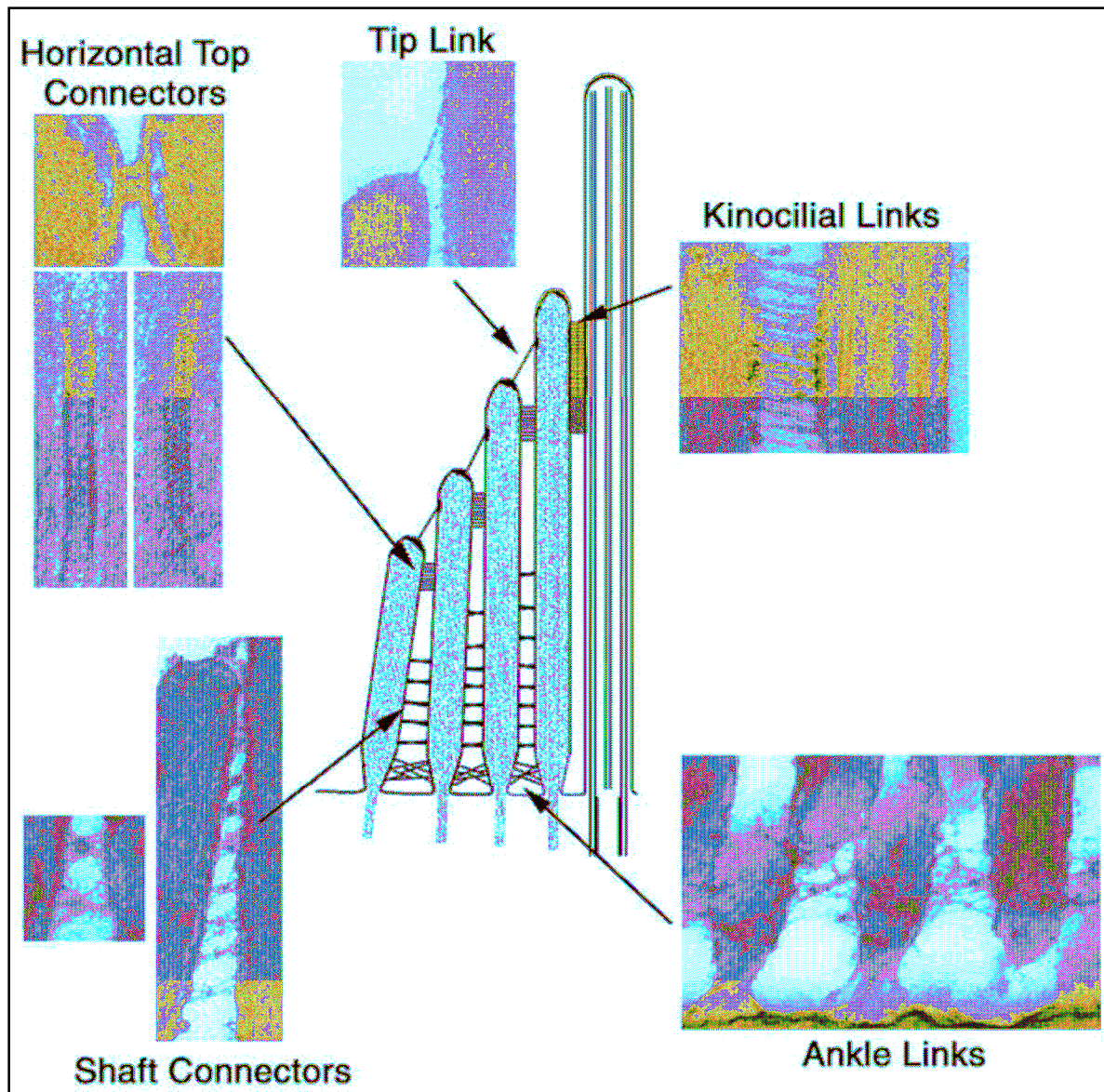


**Figura. 2:** Esquema del oído interno (adaptado de Purves et al., 2001).

Los estereocilios se conectan lateralmente entre sí mediante diferentes uniones: uniones apicales (*tip links*), uniones superiores horizontales (*horizontal top connectors*), uniones intermedias (*shaft connectors*) y uniones basales (*ankle links*), que estabilizan su estructura madura y participan en el proceso de mecanotransducción de señal (Figura 3). Para funcionar correctamente, los estereocilios deben estar organizados en filas escalonadas. Las células ciliadas están cubiertas por la membrana tectoria, una matriz extracelular rica en colágeno. La vibración del estribo se transmite a través de la ventana oval a la perilinfa del conducto coclear, haciendo vibrar la membrana basilar, lo cual desplaza al epitelio sensorial contra la membrana tectoria. Este movimiento tiene como consecuencia el desplazamiento angular de los estereocilios, lo que provoca la apertura de los canales iónicos mecanosensibles de las células ciliadas, permitiendo el flujo de potasio hacia el interior celular, lo que despolariza a las células ciliadas. Estas, en respuesta a las variaciones de su potencial de membrana, liberan en su parte basal neurotransmisores, los cuales actúan sobre las correspondientes terminaciones periféricas de las neuronas aferentes. Los cuerpos celulares de estas neuronas se encuentran en el ganglio espiral. Sus extensiones centrales forman la parte auditiva del



nervio vestibulo-coclear, que lleva la información al sistema nervioso central (Dallos et al., 1996; Fukuda et al., 2002).



**Figura 3:** Los distintos tipos de uniones entre estereocilios. El diagrama central ilustra los cinco tipos de uniones que se observan en el paquete de estereocilios de las células ciliadas del oído interno: uniones apicales (*tip links*), uniones superiores horizontales (*horizontal top connectors*), uniones intermedias (*shaft connectors*), uniones kinociliares (*kinocilial links*) y uniones basales (*ankle links*) (Nayak et al., 2007 adaptado de Goodyear & Richardson, 1992; 2003; Goodyear et al., 2003).

## **2. Aspectos generales de las hipoacusias**

La hipoacusia es la enfermedad sensorial más frecuente en humanos. Se puede manifestar en cualquier fase de la vida y con diversos grados de intensidad. La manifestación grave de la sordera en la primera infancia puede tener un impacto muy negativo en el desarrollo del lenguaje, en el aprendizaje y en la integración social. La manifestación tardía, en la etapa adulta, afecta a la calidad de vida, pues favorece el aislamiento social (Petit *et al.*, 2001; Kalatzis & Petit, 1998).

La hipoacusia se puede originar por diferentes causas, que incluyen factores genéticos, factores ambientales o la combinación de ambos (Kalatzis & Petit, 1998). Entre las causas ambientales destacan las infecciones prenatales (citomegalovirus, herpesvirus, rubeola, toxoplasma), las infecciones postnatales (meningitis bacterianas), el sufrimiento fetal, la hiperbilirrubinemia, los fármacos ototóxicos (Guilford *et al.*, 1994; Kalatzis & Petit, 1998; Kochhar *et al.*, 2007) y la exposición al ruido excesivo (WHO, 2005).

De acuerdo con la gravedad de la pérdida auditiva, la hipoacusia puede ser clasificada como: Leve, (entre 21 dB y 40 dB), Moderada (entre 41dB y 70 dB), Severa (entre 71 dB y 95 dB) y Profunda (pérdidas mayores de 95 dB). De acuerdo con la edad de manifestación, se puede clasificar en: Prelocutiva, con manifestación antes de la adquisición del lenguaje, y Postlocutiva, con manifestación después de la adquisición del lenguaje; en general es menos grave, pero suele ser progresiva (Smith *et al.*, 2005). La hipoacusia puede ser también clasificada de acuerdo con la localización de la lesión, como: Conductiva, cuando la lesión se localiza en el oído externo y/o en el oído medio; Neurosensorial, cuando las lesiones se localizan en el oído interno, nervio auditivo o en centros auditivos corticales del cerebro; y Mixta, que es la combinación de hipoacusia conductiva y neurosensorial (Smith *et al.*, 2005). La sordera puede manifestarse como uno de los signos clínicos de una enfermedad más compleja (sordera sindrómica) o de manera aislada (sordera no sindrómica) (Kalatzis & Petit, 1998).

### 3. Epidemiología genética

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, en el año 2005, unos 278 millones de personas presentaban algún tipo de pérdida auditiva, de moderada a profunda. En los países desarrollados, se estima que la hipoacusia tiene una incidencia de aproximadamente dos casos por cada mil nacimientos (Morton & Nance, 2006) y que 60-70% de los casos son de etiología genética (Petit et al., 2001; Morton, 2002). Aproximadamente el 70% de las hipoacusias genéticas prelocutivas son no sindrómicas, siendo sindrómicas el 30% restante. Se han descrito más de 400 tipos de hipoacusias sindrómicas (Van Camp et al., 1997; Toriello et al., 2004).

Las formas no sindrómicas de hipoacusias hereditarias son clasificadas de acuerdo con su modelo de herencia: autosómica recesiva (loci denominados DFNB más un número que hace referencia al orden en que fueron descubiertos), autosómica dominante (loci DFNA), ligada al cromosoma X (loci DFNX), ligada al cromosoma Y (DFNY) y materna-mitocondrial. El nombre del locus se utiliza también para denominar al correspondiente subtipo de hipoacusia. El patrón de herencia autosómico recesivo se observa en aproximadamente el 80% de los casos, el autosómico dominante en el 20% de los casos, la herencia ligada al cromosoma X en el 1% y la herencia mitocondrial en otro 1% (Morton, 2002). Las formas autosómicas recesivas son típicamente prelocutivas, mientras que las formas autosómicas dominantes son en general postlocutivas (Cryns & Van Camp, 2004).

La heterogeneidad genética de las hipoacusias no sindrómicas es extremadamente elevada: hasta la fecha, han sido cartografiados 46 loci DFNA y 28 genes han sido identificados; 72 loci DFNB han sido cartografiados, con 42 genes identificados; 4 loci DFNX han sido cartografiados y 3 genes identificados; 1 locus DFNY ha sido cartografiado, y mutaciones en dos genes mitocondriales han sido identificadas (The Hereditary Hearing loss Homepage - <http://hereditaryhearingloss.org/>).

Este trabajo se centró en el estudio de cinco genes cuyas mutaciones causan hipoacusia no sindrómica de herencia recesiva y que tienen en común el codificar proteínas del paquete de estereocilios de las células ciliadas. A continuación presentamos brevemente cada uno de ellos.



#### 4. Locus DFNB31: gen de la Whirlina

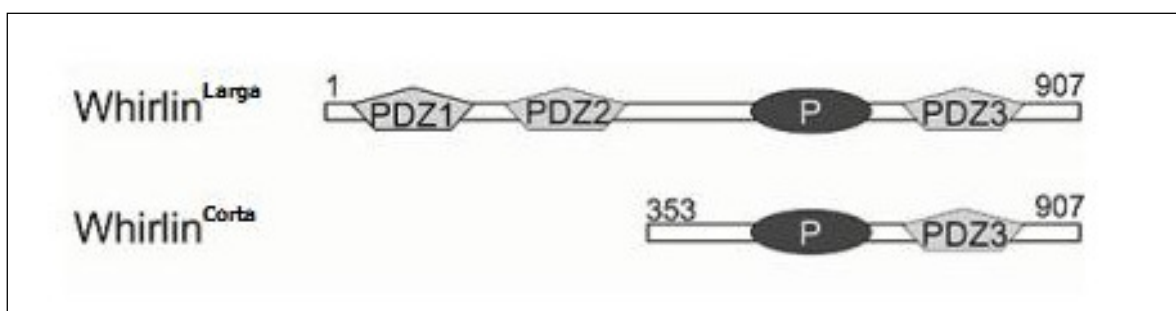
El locus DFNB31 (MIM# 607084), fue cartografiado en la región cromosómica 9q32-34 mediante el estudio de una familia consanguínea de Jordania (Mustapha et al., 2002). La región homóloga se encuentra en el cromosoma 4 murino, y en ella se había localizado la mutación responsable del fenotipo *whirler* (*wi*), que se caracteriza por sordera profunda y disfunción vestibular (Fleming et al., 1994, Mustapha et al., 2002).

Un estudio posterior demostró que mutaciones en el gen *WHRN* humano eran responsables de la hipoacusia de tipo DFNB31, y que mutaciones en el ortólogo murino, *Whrn*, eran responsables del fenotipo *whirler* (Mburu et al., 2003). Además, se han identificado mutaciones en el gen *WHRN* en una minoría de familias con síndrome de Usher (caracterizado por la asociación de hipoacusia y retinosis pigmentaria) (Ebermann et al., 2007; Audo et al., 2011; Besnard et al., 2012).

El gen *WHRN* contiene 12 exones y codifica la proteína denominada whirlina. Por escisión alternativa de exones, se generan dos transcritos que dan lugar a las dos isoformas de la proteína. La isoforma larga, codificada por los exones del 1 al 12, se compone de dos dominios PDZ en la región N-terminal, seguidos por un dominio rico en prolina y un tercer dominio PDZ en la región C-terminal (Figura 4). La isoforma corta, codificada por los exones del 6 al 12, carece de PDZ1 y PDZ2 en la región N-terminal y sólo comprende el dominio rico en prolina y PDZ3 (Mburu et al., 2003). La isoforma larga es la única que se expresa en los fotorreceptores de la retina (en el cilio de conexión), mientras que ambas isoformas se expresan en el oído interno (Yang et al., 2010). Por medio de los dominios PDZ, la whirlina interacciona con otras proteínas cuyos genes también están implicados en hipoacusias no sindrómicas o síndrome de Usher: la usherina (Adato et al., 2005), la espina (Wang et al., 2012) las miosinas VIIa y XV (Delprat et al., 2005, Belyantseva et al., 2005), y las proteínas VLGR1b (van Wijk et al., 2006) y SANS (Maerker et al., 2008). Otros ligandos de la whirlina son: la proteína p55 que pertenece a la familia de proteínas MAGUK (Mburu et al., 2006), el canal de calcio Ca(v)1.3 (alpha(1D)) (Kersten et al., 2010) y la proteína RPGR (Wright et al., 2012).

La deficiencia en whirlina ocasiona defectos de crecimiento de los esterocilios (Mburu et al., 2003; Holme et al., 2002). En el mutante homocigoto *whirler*, los estereocilios de las células ciliadas internas son considerablemente más cortos que en

el ratón silvestre. Por su parte, los estereocilios de las células ciliadas externas presentan una longitud casi normal; en cambio, el paquete se dispone en forma de “U”, en vez de las habituales formas de “V” o “W”. Los resultados experimentales obtenidos hasta la fecha sugieren que la whirlina es un componente del esqueleto submembranar de las células ciliadas, un complejo de proteínas que controlan la polimerización de la actina y el crecimiento de los estereocilios (Mburu et al., 2003).



**Figura 4:** Isoformas de la whirlina.

## 5. Locus DFNB84: gen *PTPRQ*

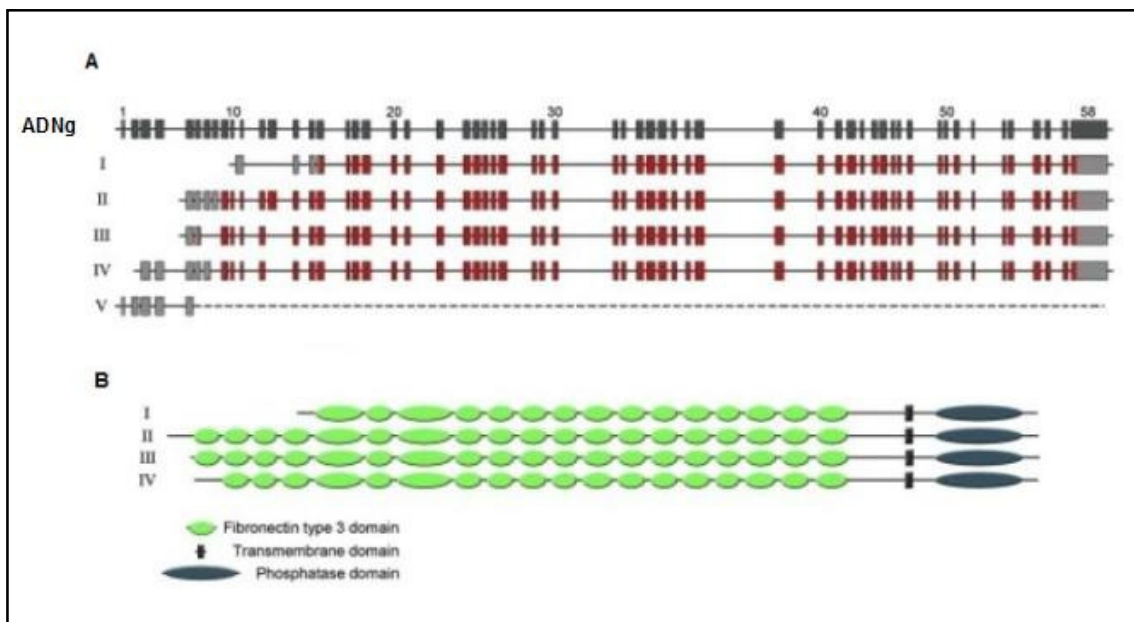
El locus DFNB84 fue localizado en el brazo largo del cromosoma 12 (12q21), mediante el estudio de dos familias consanguíneas de origen palestino con hipoacusia no sindrómica de herencia autosómica recesiva (Shahin et al., 2010). Posteriormente se descubrió que las dos familias estaban emparentadas (Shahin et al., 2010). En un estudio independiente, se describieron dos familias más (una holandesa y la otra marroquí), que también presentaban ligamiento a DFNB84 (Schraders et al., 2010). En estos dos casos familiares, los sujetos afectados presentaban además disfunción vestibular.

Las mutaciones responsables de este tipo de hipoacusia se encontraron en el gen *PTPRQ* (**P**rotein **T**yrosine **P**hosphatase **R**eceptor **T**ype **Q**) (Schraders et al., 2010; Shahin et al., 2010). Este gen contiene 58 exones y se ha demostrado que codifica al menos cuatro diferentes isoformas, como resultado de la escisión alternativa de exones (Figura 5A) (Seifert et al., 2003; Schraders et al., 2010). Todas las isoformas de la proteína PTPRQ tienen en común una extensa región extracelular compuesta por un número variable (15-19) de dominios de tipo 3 de la fibronectina (FN3), seguida de un dominio transmembranar y del dominio fosfatasa, que es citoplasmático (Figura 5B) (Schraders et al., 2010). Se ha demostrado que *PTPRQ* es una fosfatidil-inositol

fosfatasa, que desfosforilaría el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PI(4,5)P<sub>2</sub>) (Oganesian et al., 2003).

En ratones mutantes nulos para *Ptprq*, los estereocilios no maduran correctamente: los de las células ciliadas internas están ausentes o aparecen fusionados, y los de las células ciliadas externas están muy acortados. Además, están ausentes las uniones intermedias (*shaft connectors*) entre estereocilios (Goodyear et al., 2003).

En la cóclea de ratón madura, la expresión de *Ptprq* está restringida a la región basal del paquete de estereocilios (Goodyear et al., 2003). Se ha sugerido que esta distribución es debida a que PTPRQ es transportada a la base del estereocilio por la miosina VI (Sakaguchi et al., 2008). Una vez allí, PTPRQ y la miosina VI formarían un complejo esencial para estabilizar la unión entre la membrana y el citoesqueleto en la parte basal del estereocilio (Sakaguchi et al., 2008). Además, la actividad fosfatasa de PTPRQ sería responsable de mantener la zona basal del paquete de estereocilios libre de PI(4,5)P<sub>2</sub>. Éste participa en el proceso de mecanotransducción, y se acumula en el extremo distal del paquete, pero está ausente de la base del mismo (Hirono et al., 2004), de lo cual sería responsable *PTPRQ*.



**Figura 5:** (A) Estructura exón-intrón del gen *PTPRQ*. Debajo del ADN genómico se muestra la composición de exones de los transcritos conocidos. En color naranja se indica la extensión de la región codificante en cada uno de ellos. (B) Representación esquemática de la estructura de la proteína *PTPRQ*. Las isoformas difieren en el número de dominios FN3: 19 en las isoformas II y III, 18 en la isoforma IV, y 15 en la isoforma I. (Adaptado de Schraders et al., 2010).

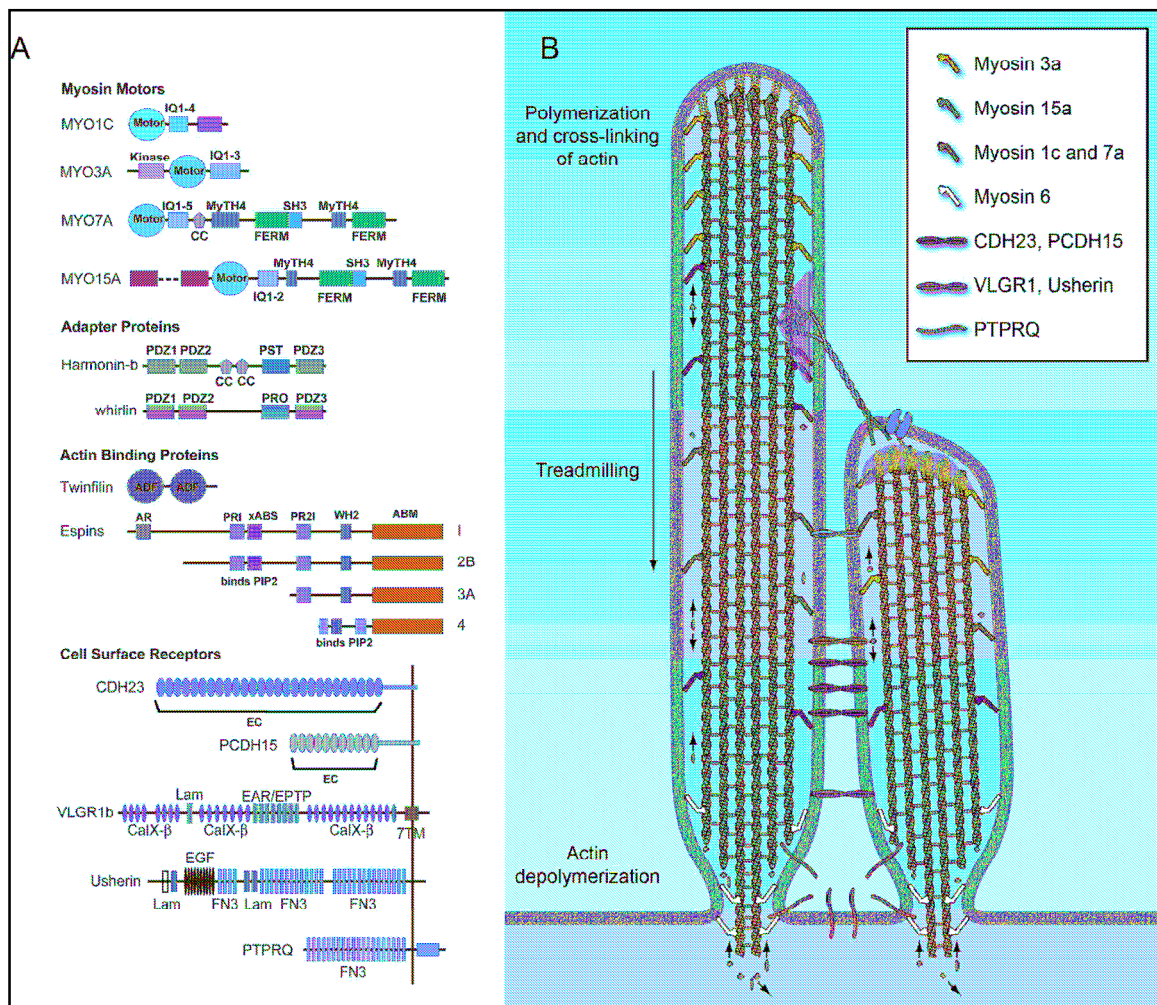
## 6. La superfamilia de miosinas

Las miosinas constituyen una superfamilia de proteínas motoras que hidrolizan adenosina trifosfato (ATP) para producir fuerza y movimiento (Mermall et al., 1998). La hidrólisis del ATP genera un pequeño cambio conformacional en el dominio motor de la proteína que es amplificado y traducido en movimiento a lo largo de filamentos de actina (Mooseker et al. 1995; Mermall et al., 1998; Sellers 2000; Schliwa et al., 2003). Los dominios estructurales característicos de las miosinas son: a) una región motora en la zona amino terminal de la proteína que contiene los sitios de unión a actina y a ATP, y que está muy conservada a lo largo de la evolución (Sellers 2000); b) la región del cuello (*neck region*) que está compuesta de un número variable de motivos IQ para unión de calmodulina y de una secuencia consenso (aproximadamente 24 aminoácidos, con la secuencia “núcleo” IQXXRGXXR) (Mooseker et al., 1995); c) una región carboxilo terminal o “cola” que difiere sustancialmente entre las distintas miosinas y que determina la especificidad funcional de cada una de ellas y su capacidad de polimerizar. Entre las miosinas no convencionales, el dominio caudal es altamente divergente y puede contener múltiples sitios de unión a proteínas (Mermall et al., 1998; Oliver et al., 1999)

Basándose en los análisis filogenéticos del dominio motor, la superfamilia de proteínas miosinas puede ser dividida en veinticuatro clases (Berg et al., 2001; Oliver et al., 1999; Sellers, 2000; Hodge & Cope, 2000; Thompson & Langford, 2002; Foth et al., 2006). Las miosinas “convencionales” o de Clase II se encuentran en el tejido muscular y otros tipos celulares. Todas las demás clases de miosinas son consideradas como “no convencionales” y están presentes en una gran variedad de tipos celulares. Las miosinas no convencionales tienen varias funciones que incluyen endocitosis, regulación de canales de iones, localización de la calmodulina, movimiento de vesículas y partículas en el citoplasma celular, localización de orgánulos, anclaje de los estereocilios (Baker & Titus, 1998; Mermall et al., 1998; Titus, 1998; Huang et al., 1999), transducción de señal (Bahler et al., 2000) y estabilización de la polaridad celular (Yin et al., 2000). En el genoma humano se han descrito 40 genes de miosinas, las cuales se distribuyen en 20 clases (Berg et al., 2001). Se han identificado siete miosinas relacionadas con la función normal del oído. Mutaciones en estos genes son causantes de hipoacusias en humanos y ratón: Miosinas IA, IIA, IIC, IIIA, VI, VIIA y XVA (Avraham et al., 1995; Gibson et al., 1995; Wang et al., 1998; Lalwani et al., 2000; Seri et al., 2000; Walsh et al., 2002; Donaudy et al., 2003) (Tabla 1) (Figura 6).

**Tabla 1:** Miosinas asociadas a hipoacusias.

Miosina	Gen	Locus en humanos	MIM#	Modelo animal
Miosina XVA	<i>MYO15A</i>	DFNB3	600316	shaker 2, <i>Myo15a<sup>sh2</sup></i>
Miosina IA	<i>MYO1A</i>	DFNA48	607841	-
Miosina IIIA	<i>MYO3A</i>	DFNB30	607101	<i>Myo3a<sup>(KI/KI)</sup></i>
Miosina IIA	<i>MYH14</i>	DFNA4	600652	-
Miosina IIIC	<i>MYH9</i>	DFNA17	603622	<i>Myh9<sup>Q1443</sup></i> , <i>Myh9<sup>(-/-)</sup></i>
Miosina VI	<i>MYO6</i>	DFNA22, DFNB37	606346;607821; 306346	Snell's waltzer, <i>tailchaser</i>
Miosina VIIA	<i>MYO7A</i>	DFNB2; DFNA11; USH1B	600060; 601317; 276900	Shaker 1, <i>Myo7a<sup>sh1</sup></i>



**Figura 6:** Proteínas del paquete de estereocilios y miosinas asociadas a hipoacusias (Schwander et al., 2010).

## 6.1. Locus DFNB3: gen de la Miosina XVA

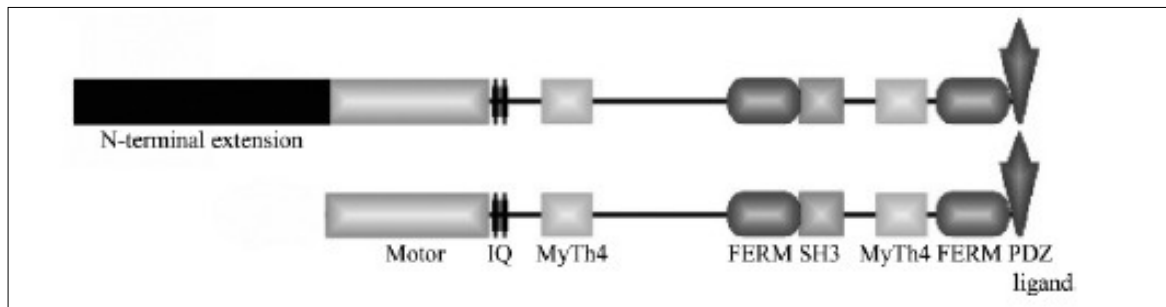
El gen para la hipoacusia no sindrómica congénita de herencia recesiva de tipo DFNB3 fue asignado a la región 17p11.2, mediante el estudio de un pueblo aislado de Indonesia en el cual el 2% de la población presentaba pérdida auditiva (Friedman et al., 1995). Posteriormente, Winata et al (1995) describen por primera vez mutaciones en el gen *MYO15A* como causante de sordera. Desde entonces, más de 40 mutaciones patogénicas asociadas al locus DFNB3 han sido identificadas en el gen *MYO15A* en distintas poblaciones (Liang et al., 1998; Wang et al., 1998; Nal et al., 2007; Liburd et al., 2001).

El gen *Myo15a* de ratón está compuesto por 66 exones distribuidos en 59 kb de DNA en el cromosoma 11qB2. El ortólogo humano tiene el mismo número de exones distribuidos en 71 kb en el cromosoma 17p11.2 (Liang et al., 1998; Probst et al., 1999). La isoforma más larga codifica una proteína de 3.530 aminoácidos con peso molecular de 395 kD y constituida por una larga extensión N-terminal, un dominio motor, dos dominios IQ y una cola que está compuesta por dos pares de dominios MyTh4/FERM, además de un dominio SH3 (Liang et al., 1999). Sobre la base de la conservación de sintenia, se propuso el ratón *shaker-2* como modelo murino de DFNB3 (Liang et al., 1998). El hallazgo de mutaciones en el gen *Myo15a* murino confirmó esta hipótesis (Probst et al., 1998; Anderson et al., 2000; Belyantseva et al., 2003).

Existen dos subclases de mRNA *Myo15a* (Belyantseva et al., 2003). Los transcritos de clase 1 se caracterizan por la inclusión del exón 2, que codifica aproximadamente 1200 aminoácidos de la extensión N-terminal. La clase 2 sufre *splicing* del exón 1 al exón 3, con la pérdida del exón 2. Las dos clases de transcritos codifican proteínas con 3493 y 2306 aminoácidos con peso molecular de 395 y 260 kilodaltons, respectivamente (Figura 7).

El dominio motor de la miosina XVA es seguido por un brazo “en palanca” que está compuesto de dos motivos IQ (IQXXRGXXR), que está implicado en la unión a calmodulina y/o a miosinas de cadena ligera. La miosina XVA puede presentar un tercer motivo IQ, degenerado. El dominio caudal de la miosina XVA está compuesto por dos dominios MyTh4 (*Myosin Tail homology 4*) dos dominios FERM (**F** por *4.1 protein*, **Ezrin**, **R**adixin and **M**oesin), un dominio SH3 (**S**rc **H**omology **3**) y un dominio PDZ en la porción C-terminal (Liang et al., 1999; Harris & Lim, 2001; Hung & Sheng, 2002; Belyantseva et al., 2003). Los dominios SH3 están compuestos por

aproximadamente 60 aminoácidos y actúan en el montaje de complejos proteicos a partir de la unión a secuencias específicas ricas en prolina, incluyendo dominios citoplasmáticos de proteínas transmembranares (Kay et al., 2000).



**Figura 7:** Subclases de mRNA *Myo15a*. Adaptado de Boger et al., 2008.

Estudios de expresión demuestran que la proteína Miosina XVA se localiza en la punta de los estereocilios de la célula ciliada (Belyantseva et al., 2003). En ratón, mutaciones *missense* en el dominio motor y una delección que lleva a la pérdida de los seis últimos exones correspondientes a la región C-terminal están asociadas al crecimiento anormal del paquete de estereocilios, que quedan muy acortados (Probst et al., 1998; Anderson et al., 2000; Belyantseva et al., 2003).

La proteína Miosina XVA tiene como función el mantenimiento de la organización de la actina en las células ciliadas del órgano de Corti. Por lo tanto, parece ser crítica para la morfología normal del citoesqueleto (Probst et al., 1998). Mutaciones patogénicas descritas en *MYO15A* incluyen las del tipo *missense*, *nonsense* y *frameshift*, distribuidas a lo largo de todos los dominios del gen *MYO15A*. Entre las mutaciones truncantes en el gen *MYO15A* y asociadas con sordera, las mutaciones p.E1105X y p.G112fs1124X están localizadas en el exón 2 y generan codones de parada prematuros antes del dominio motor (Nal et al., 2007). Este dato indica que la isoforma de clase 1 es necesaria para la función normal del sistema auditivo.

## 6.2. Locus DFNB30: gen de la miosina IIIA

El locus DFNB30 (MIM# 607101) fue cartografiado en 10p11.1 a partir del estudio de una familia consanguínea de origen judío (Walsh et al., 2002). La pérdida progresiva de la audición tenía inicio en la segunda década de vida; hacia los 50 años, se presentaba ya como severa en frecuencias altas y medias, y moderada en frecuencias bajas. En ese mismo trabajo, se describieron tres mutaciones en el gen de la miosina IIIA (*MYO3A*) que eran responsables de la hipoacusia en la familia del estudio. El gen *MYO3A* contiene 35 exones y codifica una proteína de 1616 aminoácidos.

Se han descrito dos tipos diferentes de miosina III en vertebrados: miosina IIIA y miosina IIIB (Dosé & Burnside 2000, Dosé et al., 2003). La miosina IIIA fue identificada por primera vez en fotorreceptores de *Drosophila melanogaster* como el producto del gen *ninaC* cuya inactivación produce la degeneración de la retina (Montell & Rubin, 1988). En mamíferos, la miosina IIIA se expresa en la retina (Dose & Burnside 2000) y en el oído interno (Schneider et al., 2006; Walsh et al., 2002). En el oído interno del ratón, la miosina IIIA está localizada en la punta de los estereocilios en un patrón que recuerda la forma de un dedal (Schneider et al., 2006).

A pesar de que la miosina IIIA se expresa en fotorreceptores humanos, no se han descrito defectos de visión en pacientes con mutaciones en *MYO3A*. Estudios de inmunocitoquímica de secciones de la retina con anticuerpos anti-miosina IIIA mostraron que en los seres humanos, así como en los vertebrados inferiores, la proteína se localiza en los segmentos de los fotorreceptores internos (Dosé et al., 2004). La no afectación de la visión en los seres humanos puede ser consecuencia de una compensación de función por la miosina IIIB, que sí se expresa en fotorreceptores pero no en las células ciliadas cocleares. En humanos, el gen *MYO3B* fue clonado originalmente a partir de una genoteca de cDNA de retina humana y por lo tanto se expresa en la retina, aunque su localización celular aún no se ha caracterizado (Dosé & Burnside, 2002). En ratón, la miosina IIIB se localiza en los segmentos internos de los fotorreceptores. Dalal et al (2011) han demostrado que los dominios kinasa de las miosinas IIIA y IIIB murinas son activos y presentan especificidades de sustrato similares. Estos dominios kinasa se autofosforilan.



La miosina IIIA y la proteína Espina1 influyen en el crecimiento de los estereocilios. La proteína Espina1 se colocaliza con la miosina IIIA en la punta de los estereocilios y la sobreexpresión de las dos proteínas causa mayor alargamiento de los estereocilios, en comparación con la sobreexpresión única de miosina IIIA o la sobreexpresión única de Espina1 (Salles et al., 2009).

Walsh et al (2011) describen un ratón *Myo3a*<sup>KI/KI</sup> como un modelo genético para la pérdida de audición en la edad adulta de tipo DFNB30. La pérdida de audición en ese ratón mutante es progresiva, afectando primero a las frecuencias altas, seguido de los demás rangos de frecuencias, de forma similar al fenotipo humano. La correlación anatómica de la pérdida auditiva en los ratones *Myo3a*<sup>KI/KI</sup> es la degeneración de las células ciliadas externas, que progresa con la edad.

### **6.3. Locus DFNB37: gen de la miosina VI**

Ahmed et al. (2003) localizaron el locus DFNB37 (MIM#607821) en la región 6q13 mediante el estudio de tres familias paquistaníes con hipoacusia neurosensorial congénita. En el mismo estudio se encontraron las mutaciones responsables, que afectaban al gen de la miosina VI (*MYO6*). Mutaciones en este mismo gen son responsables también de hipoacusia no sindrómica de herencia autosómica dominante (el tipo denominado DFNA22).

El gen *MYO6* contiene 35 exones y se extiende 70 kb (Ahituv et al., 2000). Su expresión es relativamente ubicua. El exón 30, codifica una parte de la proteína que contiene un sitio potencial de fosforilación por la caseína kinasa II, sufre escisión alternativa y sólo está presente en los transcritos de cerebro fetal y adulto.

La miosina VI pertenece al grupo de miosinas no convencionales (Hasson et al., 2003). En células ciliadas del oído interno humano y de ratón, la Miosina VI se localiza en la placa cuticular, específicamente en el collar pericuticular (Hasson et al., 1997), donde está implicada en el montaje, anclaje y mantenimiento de la integridad estructural del paquete de estereocilios (Self et al., 1999; Seiler et al., 2004). Además, la miosina VI está relacionada con la sinapsis en cinta de las células ciliadas internas, donde interacciona con la otoferlina, una proteína que actúa como sensor de calcio en la exocitosis sináptica (Roux et al., 2009).

En el ratón *Snell's waltzer* (sv/sv), una delección de 130pb en el gen *Myo6* genera un codón de parada prematuro (Avraham et al., 1995). El ratón *Snell's waltzer* presenta movimientos circulares, sacudidas de cabeza (*head tossing*), hiperactividad y sordera (Deol & Green, 1966). Al nacer, las células ciliadas del oído interno del ratón sv/sv son normales pero, al tercer día, los esterocilios llegan a estar totalmente desorganizados y se fusionan para formar estereocilios gigantes (Self et al., 1999).

## *OBJETIVOS*

Este trabajo se centró en el estudio de cinco genes cuyas mutaciones causan hipoacusias no sindrómicas de herencia recesiva, y que tienen en común el codificar proteínas del paquete de estereocilios de las células ciliadas: *WHRN* (whirlina, hipoacusia de tipo DFNB31), *PTPRQ* (proteína *PTPRQ*, hipoacusia de tipo DFNB84), *MYO15A* (miosina XVA, hipoacusia de tipo DFNB3), *MYO3A* (miosina IIIA, hipoacusia de tipo DFNB30), y *MYO6* (miosina VI, hipoacusia de tipo DFNB37). Para cada gen, planteamos los siguientes objetivos:

1. Determinar la prevalencia de la hipoacusia asociada, en la población española.
2. Describir el espectro de mutaciones patogénicas y de polimorfismos en la población española.
3. Investigar las correlaciones genotipo-fenotipo.

## *MATERIALES Y MÉTODOS*

## **1. Pacientes y métodos generales**

### **1.1 Pacientes**

Fueron estudiados casos familiares y casos esporádicos con hipoacusia no sindrómica compatibles con un patrón de herencia autosómico recesivo, pertenecientes a la colección del laboratorio de la Unidad de Genética Molecular del Hospital Universitario Ramón y Cajal. En todos los casos se había excluido previamente la presencia de mutaciones en el gen *GJB2* (conexina-26) y de las deleciones del(*GJB6*-D13S1830) y del(*GJB6*-D13S1854). Se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes en el estudio.

### **1.2 Extracción de ADN**

La sangre fue extraída por punción venosa y recolectada en tubos con EDTA 5mM como anticoagulante. A partir de la muestra de sangre, el ADN se extrajo utilizando el robot Chemagic MSM I (*Magnetic Separation Module I*, CHEMAGEN) (<http://www.chemagen.com>). La concentración y pureza de las muestras de ADN se determinaron a partir de los valores de absorbancia a 260 y 280 nm medidos en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

### **1.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

El diseño de los oligonucleótidos cebadores se llevó a cabo mediante los programas bioinformáticos *Primer3* y *OLIGO4*. Todas la mezclas de reacción se realizaron en un volumen final de 15 µl, utilizando solución tampón de amplificación 1X, 15µM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM de dNTPs, 10 pmoles de cebadores, 20-50 ng de ADN genómico y 0,75U de FastStart Taq DNA (Roche). El programa de amplificación consistió en 95°C por 5 minutos; 30 ciclos de: 94°C durante 30 segundos, 56°C/58°C/60°C/63°C (según se indique) 30 segundos, 72°C 30 segundos, seguido de 72°C durante 4 minutos. Además se hizo uso del buffer GC-RICH PCR System de Roche (según se indique).

#### **1.4 Secuenciación del ADN**

Se empleó el método de los didesoxinucleótidos terminadores (Sanger et al., 1977). La secuenciación se realizó directamente sobre los amplicones mediante el BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, EE.UU). Se emplearon los mismos cebadores de la PCR, realizándose la secuenciación en ambos sentidos. Los productos amplificados por PCR se purificaron con el método enzimático EXOSAP-it (Exónucleasa I and Shrimp Alkaline Phosphatase). La reacción se realizó en un volumen de reacción de 20 µl, que contenían 1,75 µl del BigDye Terminator kit de Applied Biosystems, 4 µl de buffer de secuencia (400 mM Tris-HCl pH 9, 10 mM MgCl<sub>2</sub>), 1,0 µl del cebador a 10 pmol/µl, 1,0 µl del producto amplificado y purificado y 11,25 µl de agua destilada (milliQ). La reacción de secuencia se llevó a cabo en un termociclador 9700 (Applied Biosystems), con el programa siguiente: 1) desnaturalización a 94°C (3 min); 2) 25 ciclos de desnaturalización a 96°C (10 seg), hibridación (annealing) a 50°C (5 seg), extensión a 60°C (4 min); 3) conservación a 12°C. El producto de la reacción de secuenciación se purificó mediante la técnica de precipitación con etanol al 70%. Las reacciones de secuenciación se resolvieron en un secuenciador ABI PRISM 3130 Genetic Analyser. (Applied Biosystems) y se analizaron con el programa informático Sequencing Analysis v.5.1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las secuencias se examinaron con los programas ChromasPro v1.33 (Technelysium Pty Ltd) y Bioedit (Hall et al., 2007). La nomenclatura de las mutaciones nuevas descritas en este trabajo fue revisada mediante el programa informático Mutalyzer (Wildeman et al., 2008). Para determinar el grado de conservación de los residuos afectados por mutaciones del tipo missense se empleó el programa ConSeq (Berezin et al., 2004). Se utilizó el software Polyphen2 (Adzhubei et al., 2010) para predecir el grado de patogenicidad de las nuevas mutaciones.

#### **1.5 Genotipado de marcadores microsatélites - Análisis de haplotipos**

El análisis de ligamiento ofrece la oportunidad de localizar genes médicamente relevantes siguiendo la herencia del trastorno y la de los alelos en los marcadores polimórficos, para verificar si el locus de enfermedad y el locus del marcador polimórfico están ligados (Ott et al., 1991). Para el análisis de ligamiento, se amplificaron fragmentos polimórficos de marcadores microsatélites cercanos a los genes estudiados. Se eligieron los marcadores con mayor heterocigosidad. Para la detección de los alelos del individuo problema, se marcó con fluorescencia (6FAM o HEX) el extremo 5' de uno de los cebadores de cada uno de los marcadores

microsatélites usados. Los marcadores microsatélites fueron amplificados mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en un volumen final de 15 µl, con 50 ng de DNA, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM (1,5mM), dNTPs 200 µM, 4 pmoles de cada cebador y 0,75U de Taq DNA polimerasa. El protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C/58°C/60°C/62°C (según se indique) y 30 segundos a 72°C. Se realizó un paso de extensión final a 72°C durante 4 minutos. Los amplificados de los distintos marcadores fueron mezclados con el fin de obtener una sola muestra por paciente. A 1,2 µl de cada una de estas mezclas se añadieron 0,2 µl del marcador de peso molecular GeneScan-500-ROX (Applied Biosystems) y 12 µl de formamida desionizada. Las muestras así preparadas fueron desnaturalizadas a 95°C durante 3 minutos antes de ser analizadas por electroforesis capilar en un secuenciador ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems).

### **1.6 Ensayos de minisequenciación (*SNaPshot*) para estudios de controles**

El método de minisequenciación (*SNaPshot*) es una metodología que se basa en una extensión de cebador en presencia de didesoxinucleótidos (ddNTPs) marcados fluorescentemente. El cebador (no marcado) se posiciona adyacente por su extremo 3' al nucleótido que se quiere interrogar. En la reacción de minisequenciación se produce la extensión del cebador, con la adición de un único ddNTP. Se pueden combinar los productos de varias reacciones de minisequenciación. Dichos productos se resuelven mediante electroforesis capilar en el secuenciador automático (ABI PRISM 3100), junto con un marcador de peso molecular interno (GeneScan™-120 LIZ, Applied Biosystems).

### **1.7 Análisis de heterodúplex de ADN en dHPLC**

El fundamento de esta técnica consiste en detectar mutaciones mediante la formación de heterodúplex de un determinado fragmento de ADN. El producto de la PCR sufre calentamiento a 95°C, lo que permite la desnaturalización de la doble hélice del ADN, seguido de una lenta reducción de la temperatura, renaturalización gradual y la formación de homodúplex (fragmentos de ADN con las dos hebras emparejadas correctamente) y heterodúplex (unión incorrecta entre una hebra normal y una hebra con la mutación). A continuación, los fragmentos de ADN pasan por una columna de cromatografía líquida de fase reversa (dHPLC, cromatografía líquida desnaturizante de alta resolución (Denaturing High-Performance Liquid Chromatography)). Los



heterodúplex, por tener menos fuerza de ligación, eluyen en primer lugar. A través de un detector ultravioleta, se mide la absorbancia y los resultados son enviados a un ordenador que genera un cromatograma cuyo análisis permite la detección de las mutaciones. Para estos análisis fue empleado el sistema de DHPLC Transgenomic Wave™ (Transgenomic) y el software Transgenomic Navigator (Transgenomic).

## 2. Locus DFNB30 (gen *MYO3A*)

### 2.1 Análisis de haplotipos

Para el análisis de ligamiento, se amplificaron fragmentos polimórficos de marcadores microsatélites cercanos a *MYO3A*: D10S89, D10S572, D10S111 y D10S1775. Las condiciones para su amplificación son las descritas en el apartado 1.5 y los cebadores correspondientes se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Secuencias de los cebadores utilizados para los microsatélites del locus **DFNB30**

Microsatélite	Cebador directo 5' → 3'	Cebador Inverso 5' → 3'
<b>D10S89</b>	AACACTAGTGACATTATTTTCA	AGCTAGGCCTGAAGGCTTCT
<b>D10S572</b>	CAGTGATTTTAGACAGGGATTTTA	AATTATGATACTTATTGATGGGGA
<b>D10S111</b>	GAAAAGTCTTAGAATTTTGCAG	CCAAAGTGCTGAATTTTCAGG
<b>D10S1775</b>	CTCCCCTAGTTAATGGATGTAT	ACAGGTATTGCTGAGTGAGA

Se emplea  $MgCl_2$  1,5mM y una temperatura de hibridación de cebadores de 58°C para la PCR de amplificación de los moldes.

### 2.2 Secuenciación del gen *MYO3A*

La secuenciación de cada exón constituyente del gen *MYO3A* junto con sus secuencias intrónicas adyacentes se realizó como se indica en el apartado 1.4. Los cebadores diseñados para este estudio son descritos en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Cebadores utilizados para la amplificación del gen ***MYO3A***

Exón	Cebador directo 5' → 3'	Cebador Inverso 5' → 3'	Temp. hibridación
1	CCCAGTTCTTCCCCTGCT	ACAGGTCCTCCGGATCTGAC	63°C
2	TTTTCCCCAGATCCTGAATG	CTGGCAAACCCAGAACACTT	56°C
3	GGTTTGTGTGTGCCATTTGA	CCTGTTTTAGACTGCTATTGTGATG	56°C
4	TCTGTTTCTTTGACATTACTCATGG	TCCACCCATACAAATGATGC	56°C
5	TCATTTGAAAGAGAACATTGGAA	TGCTTCATAATTAATGCACATACAA	60°C
6	TGTTTGATGCTTTTGTAAAGAGTCA	AGGAAGGCCATTGCAAAAAG	60°C
7	GCAGGTTTGAGGAAATGGAA	GGAAAGTCAAACAGGATCAGC	58°C
8	TGCTTGTTAAAGTCACAAATTTCA	TGCAGATACTGGACCCAATG	56°C
9	TCTGGCTCTGCCTCTCATTT	GCAGGAGGGAATATCTTTGG	60°C
10	AAGCTTGGGCTGAGCATTTA	AAGTCCCCATTACCTCCAAA	60°C
11	TTTTTCCACTATGAGCAGTAATCAA	TTCCCCTTCTACCAATACCC	60°C
12	TTGACCACAAATAATTTTAAAGAAGG	TGGATAAAATTTTCTGGCATTCA	56°C
13	TTCAGGACTTAAATAAAAACAAAAGC	TGTGAGAAGACCTTATCCTCAAAA	60°C
14	TCAGGTAAGAAGAGTCTCCCATTC	TTTCTGATGGGACAGAGAAAAA	56°C

Exón	Cebador directo 5' → 3'	Cebador Inverso 5' → 3'	Temp. hibridación
15	TGCCAATATATCAGGAACATGC	GTTTGCTTCTGCTTCCTCCA	60°C
16	TGTCAAGTAACTTAAGCAAGAAATG	AAGTCTAAAATTAAGGGAAAAGTGAA	58°C
17	TTTCACITTTTCCCTTAATTTTAGACT	TCACTCAATAAATGCTCTTAACATTAG	58°C
18	CCCAGCCATAGTCACTGGTT	AAGATTTGAAAGATTTAGTTTTGA	58°C
19	TTCATTTTTGGGGAGTGACC	TCACCTGACATTTGGGAAAA	58°C
20	TCCCTGTTTTACATTACCTCTTCA	TGGTTAAGGTCCTGCTTCATTT	58°C
21	CAAGGTCAAAGGGAGCAATTT	TATGCAGGCTTTGTGACAGC	58°C
22	TGCACATTGTCCTTTTTATGG	AAAGGCTAAGGAGAACTCAGTCA	58°C
23	GATGATGGTGAGGAGGAGGA	TTGGGCTTCAGAAAACCTTCC	58°C
24	TGGGAAAAATCATCTAGCCATT	ACAAATATTGCCATCATACCG	60°C
25	CCTGAAGGAAAAATGCCACAT	GCACCCCTAAGCACAATACA	60°C
26	GGCCTACAAGCTCATACGTTTT	ATGCCTCCCTCCTAGACCTC	60°C
27	GGGAACCACCAAGCTACAGA	AATTCTCAGTGAACCCAGCA	60°C
28	GCACAGCACATAACTGCTTCA	TGGAGGTTTGCCTGTAAGAA	60°C
29	ATGGTCAAAGCCACCATTTT	CAAGAAAGGCTGTGAACATTATTCT	60°C
30A	TCTCCCACCGGTATCTAGCA	CCATGCTGTTTGCATTTTGA	60°C
30B	TGTGAAGAGTCAAAAGCAGCA	TTGTATAGTTCCAGGGACTTTTATT	60°C
31	GTGCCTGCAGAACTCTCTGT	TTTCCTTCCCATTTCAGGAAGT	60°C
32	TCCCAAAAGGAAAACATCACTT	TGATGGCTCCCCTCTGATAGT	60°C
33	TTGTATCCACTTGCTTATTTCTAACTT	TTGAACACATGGATTTTTATTTTTG	60°C
34	AGAAAATTAGATTGATGCAATGG	TTGTGAGTATAAACTGCAAATGATG	60°C
35A	GCTCACTGTGGTGAGGTTGA	GGTCTCTTGTTCGGAGCAC	60°C
35B	GTTCAACGAGGCAGTCACC	GGGGAAAATGAGGGATCAGT	60°C

En todas las reacciones se empleó MgCl<sub>2</sub> 1,5mM.

### 3. Locus DFNB31 (gen *WHRN*)

#### 3.1 Análisis de haplotipos

Para el análisis de ligamiento, se amplificaron fragmentos polimórficos de marcadores microsatélites cercanos al gen de la whirlina: D9S155, D9S1855, D9S1824 y D9S289. Las condiciones para su amplificación son las descritas en el apartado 1.5 y los cebadores correspondientes se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Secuencias de los cebadores utilizados para los microsatélites del locus **DFNB31**

Microsatélite	Cebador directo 5' → 3'	Cebador Inverso 5' → 3'
D9S155	TCCTCACTCTTCCCTCCATC	TTCCCTTGAGTCAATCCCTGA
D9S1855	ATAAGGCTGCTTTTTGCG	GATTAGAGGTGTGAGCCACTAC
D9S1824	GTGTTCTCCAGAGAGACAGAGC	TCCTAATTGTGTGAGCCAATG
D9S289	TGCATTAGAAAACCTTCCA	CCCAGCCTATTTGCAT

Se emplea MgCl<sub>2</sub> 1,5mM y una temperatura de hibridación de cebadores de 58°C para la PCR de amplificación de los moldes.

#### 3.2 Secuenciación del gen *WHRN*

La secuenciación de cada exón constituyente del gen de la whirlina junto con sus secuencias intrónicas adyacentes se realizó como se indica en el apartado 1.4. Los cebadores diseñados para este estudio se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Cebadores utilizados para la amplificación del gen *WHRN*

Exón	Cebador directo 5' → 3'	Cebador Inverso 5' → 3'
1	CCCTAGGATCCAGCCACTGT	GCTGTGCCACTCTGTTCCATA
2	CGGCACCTCCCTTCCTCTAA	TGGAATGCGGTACGAGATC
3	GGGCCTCCTTGCCAGTCG	ACCTCCAGCAGAGCAATCAGCA
4	ATTGGGATCTGGGCTGTGAAGT	CTCTGCTCGCTCCAATCTCCA
5	TTGCCACGCCCATTGAT	CCTTATCTGCCCACCCCCC
6	AAGGGCAGAGGGGGAGTGG	AGAACCTACAAGGGGTGAGGCC
7	GCCAGTCCTTTGGGGGTAGC	GAGTGAGACCAGCCTGAGTTCA
8	GCTCACTTTGCTTCTCGTCCAT	AGTTTCTTAGCCTCTCTGTGCCTCA
9	CTGCTCGGCCTCCCCTCT	TGATGACACAGTGAAGGGGGG
10	CCAGCCTCCATCTCCGTAC	CTGGAGGAGCACTGGATTAGGAA
11	TGCTTGGCTTAGTGCGTTGC	CCACTTGCCATCTCTCCCTACC
12	CAGCTTTCCTAATCCGAGAAGTGA	TGTGGGGAGGGGTGGGC

Se emplea  $MgCl_2$  1,5mM y una temperatura de hibridación de cebadores de 60°C para la PCR de amplificación de los moldes.

#### 4. Locus DFNB37 (gen *MYO6*)

##### 4.1 Análisis de haplotipos

Para el análisis de ligamiento, se amplificaran fragmentos polimórficos de marcadores microsatélites cercanos a *MYO6*: D6S1589, D6S1622, D6S1031 y D6S1596. Las condiciones para su amplificación son las descritas en el apartado 1.5 y los cebadores correspondientes se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Secuencias de los cebadores utilizados para los microsatélites del locus *DFNB37*

Microsatélite	Cebador directo 5' → 3'	Cebador Inverso 5' → 3'
D6S1589	CCCTCCACATACAGTGAAAG	ATGCTTGCTTCAGCCAAT
D6S1622	GTGTATCTTAGAATGATGGCATCTT	TTATGTGACAAAGCACCAACTAT
D6S1031	CCTGATGGTCATGTGTCTGA	CGCTCATTTTATCTACCTAACC
D6S1596	GACCTCCCCAGTCACA	CCATCACCTTACAGTTACCA

Se emplea  $MgCl_2$  1,5mM y una temperatura de hibridación de cebadores de 58°C para la PCR de amplificación de los moldes.

##### 4.2 Secuenciación del gen *MYO6*

La secuenciación de cada exón constituyente del gen *MYO6* junto con sus secuencias intrónicas adyacentes se realizó como se indica en el apartado 1.4. Los cebadores diseñados para este estudio se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Cebadores utilizados para la amplificación del gen *MYO6*

Exón	Cebador directo 5' → 3'	Cebador Inverso 5' → 3'	Temp. hibridación
1	GGCGCTCCGTAGCCGTGAC	TCTCGCGTTCCCTGGCCC	60°C
2	CATGGGCAGATGTGTTTGT	GAAAAATGGTGCCCTATGATA	60°C
3	ATTGTTCTGTTTGGGGTTAATGA	TCATGTGAATGAAGGAACTCGAG	56°C
4	TTTTCCCTCTTGAATTGTGCTTT	GCTTGATCTGAGCCTCTTGAATAG	58°C
5	CAGGGAATATTTAGGACTGATTTG	GCAAGTATTTTACACAGGGTGAG	60°C
6	GCCACAGCCCATAATATCAAGACA	TGTCACCACCACAGCTCACTGTAG	56°C
7	CCACACCTGACCCCAAATAG	TTTGTAGTGGTCTGGAATGTTCTTC	58°C
8	TCCGTCATGCTAATTTTTTGAT	ACCATCTAAAAGCTCCTTTCACA	60°C
9	TTGTTTTTCCCTTTATTTGGT	AGTTCGAGAGCAGCCTGGG	56°C
10	AATTCTTCATGGTTGGCACTATT	ATCTAGTGAAGTGACAGGTTCTGG	58°C
11	TTTTTGCATGTTATATAGTGCATT	CTTTATATGCAGTTTGCTTAAAAA	60°C
12	AGTACGGGTGTTTGACAAGGATAG	TTGCAGTTTGTCGAAGGAAAAACA	56°C
13	GTTTAGGTGCACTCTGTGGCATT	TCGTGGGGATTGTTTGTATGATA	58°C
14	GTTAACATGTGGCTTACATTTTATA	TGTGGATGGATGGGTATATAACG	60°C
15	TTTTTGAAAACCATTTAAGGCTA	TTCCACCAAGACTTCAAAGGTATC	56°C
16	TTCTGATCAGTCCTTGAAATCTGT	CAGCACAGTATCTTCCTTAGATGG	58°C
17	AGGCATACTCAATACATAAAAGCAG	CACTAGCCACACTTCAGGTGC	60°C
18	TCACAGAAAGTTCCTTTGGACAGA	GAAGTTCAAGAGCAGACCCTGC	56°C
19	GTTAAACTGGAATGTGTTGTATTTG	TGAAAATAAGTGGTAATAGTGGAGA	58°C
20	TGAAAGTTGCAGGTATTCATAGAAA	AGTCCCAGCTACTTGGGTGG	56°C
21-22	AAATTATTTTGGACTTCCGAAC	ACAAATAGTTGGGGTTAGTGAATAT	60°C
23	GCCAAGGCCTATGTAATTGACATG	GAGACTTGTTTCACTGGGTCCC	60°C
24	TCATGTTTCTTGAGCATTACTTTG	AGGTTTTCTCATGTTCTTTGTAATA	58°C
25	TTTTATAAATGAAAAATCTGCCAAA	AGACTCAATGATGGCAAGTACATG	56°C
26	TTGTTGTGCAACAGAAGAAATAAGCT	TTTTGTGACAGGGTCTTGCTCTGT	60°C
27	TGCATTCCCAATCTGTTACCTTT	ATCACGAGGTCAGGAGATCAAGAC	60°C
28	GGCAGTTATGCTTTCCCTTTATTTT	TTCTGAAGGCCCTGATATATTTGAG	58°C
29	AACACAAATTTGCACAATCCAGATTT	AATGCTCTTGATGGTGCTCAATCA	56°C
30	CTGTGTGTTACGGCTAGATTGTTGA	TTTGGACCAGAACCTGTTACATGAG	60°C
31	GCATGCTTTCTTGCCCTTTAGTC	TCTGAATCTTTTGGTCCATGAATG	60°C
32	ATTCCTTCATATAAAAGACCTGTTT	GGGTAATAATGTCCCATATAAATTT	58°C
33	AAGCAGCACCTGCTTTTAGGTA	AACTGGAAGATGGGTTAAATACTTT	56°C
34	GTGGTATGTGTGTGTTGTGTTGG	CATAAATCTCTGAATGAAACATTC	60°C
35	GGTATTTCAAGGCATACAACCTGGTAAGA	GTGTGTGCCCCCAGATTTAACC	60°C

Se emplea  $MgCl_2$  1,5mM para la PCR de amplificación de los moldes.

## 5. Locus DFNB84 (gen *PTPRQ*)

### 5.1 Análisis de haplotipos

Para el análisis de ligamiento, se amplificaron fragmentos polimórficos de marcadores microsatélites cercanos a *PTPRQ*: D12S1684, D12S1347, D12S1708. Las condiciones para su amplificación son las descritas en el apartado 1.5 y los cebadores correspondientes se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Secuencias de los cebadores utilizados para los microsatélites del locus *DFNB84*

Microsatélite	Cebador directo 5' → 3'	Cebador Inverso 5' → 3'
D12S1684	GCCTCAGTTATGAGCCAATAAATTC	GTAAGCCTGGTAACATTTGTGGAC
D12S1347	TGTAACAAACCTGCATGTTCTGCAC	AAATCCATCCACATTCAAGGGG
D12S1708	GGGAACCTTATGTCAAGGCTAGGA	GATCTAGTGCTCAAGAGGTTTTCAA

Se emplea  $MgCl_2$  1,5mM y una temperatura de hibridación de cebadores de 58°C para la PCR de amplificación de los moldes.

## 5.2 Secuenciación del gen *PTPRQ*

La secuenciación de cada exón constituyente del gen *PTPRQ* junto con sus secuencias intrónicas adyacentes se realizó como se detalla en el apartado 1.4. Los cebadores diseñados para este estudio se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Cebadores utilizados para la amplificación del gen *PTPRQ*

Exón	Cebador directo 5'→3'	Cebador Inverso 5'→3'	Temp. hibridación
1	CCATGGAATATAGCCCAGC	TGGGTATCTATAGAAAGAGAACTG	58°C
2	CTGCTTTATCATGAAGGAAATC	TTTCCTGCAGAGAAGGTAAGT	56°C
3	TTCTGTTACGTTCCATTGCC	CGAAGTGCTGGGCTGAC	60°C
4	GTGGAAGAGCCAGGACTCAC	CGGTGAAATTGCACAGAAAC	58°C
5	TGTATAGCCTGTCAGAATATCTACC	TTTACTGCAGGCACATAATACC	58°C
6	AACTGTCATTGAATGTGTAACAAC	TGTAAGAATGCAGTAATGTTGG	56°C
7	TGCTGAAACCAACATTACTGC	TTGTGATAACCCATACCAAGG	58°C
8	TTTATTCCCAAAGGCAGATG	CGTATCAACCCATCACCTAAG	58°C
9	TAGAGTCAATTCTGAGGGC	AGTTATTCTGATCAGACTGTAGTCC	58°C
10	GCAGCAAATTATTTCCATGATAG	TCATTCTAATTAGGCATTGTCC	58°C
11	TCAAGGTTATTGGTTCAGCC	ATTATCCTCCAGCACCACC	58°C
12	GGAAGGATCACAACCTCTACC	CAACCATAATCATGCTTAGCC	56°C
13	TTGGGAAGTAGAGAGAATATTGTTG	AATCTGCAGAACAGCCAC	58°C
14	TTATTGTAAGTCAAGTATTCTAACAAC	CACCAATGCTGAAACTTAACAC	56°C
15	TAGCTTGCTTGCTTTCCAGA	TGCCAGTATAAGTATTTCCATCCA	60°C
16	TGTGAAGTCAATTTGCTCTTTGG	AAAATGAATGAAATGTTTGAACACTAA	60°C
17	ATCTTTGGCATTATCTTATGG	TAAGTGGCCATGCTACTGAG	57°C
18	AAGGAAATAAGAAATTTATCCCAAC	TCCTTGCTCCATGGTGTATC	57°C
19	AAAATGTCAGACATAAATGGG	AAGAAACCCCTTGATGGGATG	57°C
20	AAGCGCGATATTTTATTTTCC	TGACTTTCTATTGTTTGCTTC	56°C
21	TGTACTTAAATGTGAACATGATTGC	TTGCTTCTAATATCATGTTTACCAAT	60°C
22	AAATTGTGAAGTAAAGATTTAGGC	AAATTGTGAAGTAAAGATTTAGGC	57°C
23	CTTGATTTAAGTCATGAAGTGAAGT	GCACTGGTGGTTTAAATGAAGT	60°C
24	TGATTGTGAAGCCAAACACC	AAAAAGTATCACAGTGTACAACAGCA	60°C
25	AATGAATACGGAGAAATCAGG	AGTATATAAGGCACAGGGAGATG	57°C
26	ACTGCAATTATTTGGAAGCG	CGGTTCTAGGGGAAGAAAAG	57°C
27	TCACTGCCTTCACTTCATGC	ATGGCGATTATCAGCTTTGC	60°C
28	CAGTGACAATTTCAAGCAGATAGA	TGTCATTATAAATGCAAAATATCCAA	60°C
29	TGACAGCCATTTTATAGTTTGC	ACGTGTGTTTCTTGAATGTT	60°C
30	TGTGCATTTCCATGTTAACTTTT	TCAGGTTCTAATGTAGCACCA	60°C
31	GTGTGCTCAAAAAGTATTGTTAACTT	TTTTTCTGGGCAGGATTTTT	60°C
32	AAATTTCAGGCCATTTTCAAGACA	CAATTTCTTTTACTGTGACAAGTCTGT	60°C
33	TGTCGATTTTCTTAAACAAACAT	CGGATGTTAGCAGTTTCTTGA	60°C
34	TGTTTGCCACATCTGCATT	AAATGAAAAGAACAACAATCTGCTT	60°C
35	TCCCATTATGATTGAATCCTCTTT	CGCTGCAACAGTGAAATTGT	60°C
36	AGTCACGGTGCTATTTTATGTT	CCATTTTCTCCTATATGTCAAAAG	60°C
37	TGAGCACACTCTATGGCACA	AAACTAAGAAAAGGAAAAGAAAGGTG	60°C
38	TGACTTTTTAAGCACACATTGAAA	TTGCAGGTGGTATTGACACAA	60°C
39	CCGGAAGCATCACTCTAAGG	GTTCAAGTATTTTACACACAATTAGAT	60°C
40	TTATTGTGCTGTAGCAAGTACTAATTC	GGTTCCAAATCTTGATTATTAACCA	60°C
41	CAGATTTCAAGTGCTGCTTCC	GAAAGCCAGCTAAATCTCAGTCA	60°C
42	TCTTTAAAAACAGAAGTTCAAAGCAA	TGCCAAGTTTCAATAAAGTACATT	60°C
43	ACTTCATTGTTAATGTTCTTCTTACA	GGCTTGCTACATCCTTATTTCAA	60°C
44	AACTGCATGAAAGGAGAAAGATT	GCACTCAGTAATCTACACTCCACAA	60°C
45	TGCATCGAGAGTCCCTTAT	AGGCAGATGGATGGATGAAA	60°C
46	TCATCTTGTAATTCATTTTCTTTTGA	TCCAACCTTGATAAATATGTTGAGATT	60°C
47	TTGGGATTCAAAAATAAGATTCCA	AATGCCCATAAAGCATCCTG	60°C
48	TCAGAGAGGTGATTTTAAACAAGGA	CCCTCTGGACCACAGTTCAC	60°C
49	GGCATGACACATTTTACATTATTGA	CAACATACAAAAAGTGAATCACACA	60°C
50	TGATTTTGGGGATGTCCATT	GAAACGACTGGAGGTCTTGC	60°C
51	TGACCTTGTTTCCACAGTTATGA	GGTAGTCACTGCCAATAAAATACA	60°C
52	TACCGCCATCTGTGAAATTG	AATTTGTTGTTTTAAGTAATTGGAAG	60°C
53	TGCATTGATCGAAAACATAAACA	CAATCGTAAAACAACATTTGTAAAACA	60°C
54	CTGTGAGTCATCAATAACCTGGA	TCATATTTTATATCATGTTCTCTCGTC	60°C
55	AAAATGGGACTATTGCCTTCA	AAGACCAATGGGTTCAAAGG	60°C
56	TCAAAATGAACAACCCCTTTGC	GATCTCCCATGTGGAAATTCT	60°C
57	TGAATTCAGTACTGCTTTTACGTTT	TGTTCTTACCGTAGGTGGTAAAC	62°C

58	TGGGCTAATAATACCCTTTCTGTC	TGCACATTCAATTGGAAG	60°C
----	--------------------------	--------------------	------

Se emplea MgCl<sub>2</sub> 1,5mM para la PCR de amplificación de los moldes.

Hemos diseñado un ensayo específico de minisequenciación para la mutación p.Arg2377\* hallada en el gen *PTPRQ*, utilizando el cebador 5`GGGATTGCATGACTGTT3` y como molde el amplificado por PCR del exón donde se localiza la mutación.

## 6. Locus DFNB3 (gen *MYO15A*)

### 6.1 Análisis de haplotipos

Para el análisis de ligamiento, se amplificaron fragmentos polimórficos de marcadores microsatélites cercanos al gen *MYO15A*: D17S953, D17S2196, D17S1794, D17S1871 y D17S2207). Las condiciones para su amplificación son las descritas en el apartado 1.5 y los cebadores correspondientes se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Secuencias de los cebadores utilizados para los microsatélites del locus *DFNB3*

Microsatélite	Cebador directo 5' → 3'	Cebador Inverso 5' → 3'	Temp. hibridación
D17S953	ACTATCCGCCCAATACA	AAGGGCTTGCTTTGAC	60°C
D17S2196	CCAACATCTAGAATTAATCAGAATC	ATATTTCAATATTGTAACCAAGTCCC	52°C
D17S1794	GGTAGAGATGGGTTTCACCA	GTGTGTCCAGACTTTGACGA	58°C
D17S1871	CGTGGCCTATTATGAGACTTC	GATTTAGGTAGGGTTCTCCAG	58°C
D17S2207	TATTCTTACCACCTCCCCTG	CAGGACCTGCTAGTGCAGG	60°C

Se emplea MgCl<sub>2</sub> 1,5mM para la PCR de amplificación de los moldes.

### 6.2 Secuenciación del gen *MYO15A*

La secuenciación de los 66 exones constituyentes del gen *MYO15A* junto con sus secuencias intrónicas adyacentes se realizó como hemos indicado (aparto 1.4). Los cebadores diseñados para este estudio se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Secuencias de los cebadores utilizados para *MYO15A*

Exón/Amplicon	Cebador directo 5' → 3'	Cebador Inverso 5' → 3'	GC Rich Buffer
1	AGCTGCTCACTCCTTTCCAG	AGACCCCAAGGACTCTAGGC	-
2.1	TTCCCCATCCTGGTAAACAA	AGAAGCCGTCCTTCATGGT	3μL
2.2	GTCAAAGCTCATGACGCAGA	ACGACTACTACGACCGGCAG	3μL
2.3	CAGGACCTGGGCGAGTATTAT	CCTTTGTGTACCCCTGGGTA	3μL
2.4	GTCCACTACACCGTCCCCTA	AGGTCCAAGCTGTCCCTC	3μL
2.5	AGCAGCAAGGCATGGATAAG	CTTTCTGGGGCTTCCTCAC	3μL
2.6	AAGAGGACGAGGAGGAGCTG	CTCAGGGGCAGCCAGAAG	3μL
2.6.1	AAGAAGACGCTGTCGGAGAA	CAGGACCCTCTCCCCTGG	3μL
2.6.2	CAAACGCTTCGGCTACAAG	ACCTACTAGCCTTCCCAGGG	3μL
2.6.3	CCCCGACCTACTAGCCTTCC	GGCTACTGCTACCCCTTGG	3μL
2.6.4	GGAGGCGAGCTTGGTCAC	GCTGTGAAGCCGCAAGTG	3μL
2.7	GCTGTGAAGCCGCAAGTG	GCAAAAGACATTAAGGCCCA	3μL

Exón/Amplicon	Cebador directo 5' → 3'	Cebador Inverso 5' → 3'	GC Rich Buffer
2.8	CAGCACCTCCCAAGGATG	GCAAGAGAGACAGCCTGAGG	3μL
3	CTCCCCAACATGGTAGCAG	ATGGTGACCCCTTGCTGAC	-
4	ACTGAGTTGGGGAGGGAGAC	TAGGGCCCCACAAGAGAAATC	-
5	TAGGGGAGGGAGGGACATAG	AAAGAGGGGGCCCAAGAGAC	-
6	ATTGGCTGTTTGGCTGGATA	GCTACCTAAGGTCCCCCATT	-
7	CGAAAGGTTGGAGCTCACTC	AGCCTCCTCATCTTCCTGGT	-
8	TCCTGGAGAGAGTGGTGGTC	ACGCATTTTCCTGGACAGAC	-
9	GAAGGCTCATGTCTGGGTGT	AGACACTGCAAGGCTTTTGG	-
10	AGCCTTGCAGTGTCTTCCAT	GGCCAGGCTCTGAGTATCTG	-
11	AGGCTTGGGCTTGTATGTGT	CACTCCATCACTCACAACCTCG	-
12	GCAGAGCAGGACCTGGAG	AAGACGGCCAAGTCCAGAG	-
13	GACTACTGGCATGAGCCACA	CTTTGTTTGAAGGCCAGATG	-
14	TCCATGATCCCACTCCCTTA	GAGGTGGTGTCTGGTGTGAG	-
15	CTGTGGATGCCAGGTGAG	CCCTCAGCCTCCTACACG	-
16	GCTGAGCTCCAGCTTTTGA	TATTAATGGGGCCACACAC	-
17	GCTCCTTCAGATTCAACATGG	CTGACTAGGCTCACACAGTGC	-
18	CCAGGAACAGGGTGTCCA	TCTCCAACAGCTAGCAGCAC	-
19	TGGGGACCATAGAAGTGAGG	GTGGGAGGCGAGGCTTAC	-
20	GACCCTGCCTGTCTGTTTTT	GGTCATGAGGTGGGTTAAGG	-
21	ACCCAGCCTCATCCTTAACC	TCTCTCAGAGGCCTCAGCTC	-
22	CCAATGTGCAGACTCCCTCT	GTTGGGCAGGGATTGTAGA	-
23	GACACCTCGGGTAGGTCTCA	GGTCTCCAAGGGCTGACTGT	-
24	TGGCTCCTATCTGCCTCAGT	CGAGCCTGACCATAGGTCTC	-
25	GCAAGGGCCTCTCTACCTTT	TAAGTGCCCTTTCCCCTTCT	-
26	GTGCCGGTCGTCACCTCT	CCTAGAGGGACAGTGCATGG	-
27	GAGGTGGGTGTGGGTCTG	TGGAAAGAGGAGGGAATGC	-
28	CCCAGGCAGATCAGAGCAG	AATTGGTCAGCGCCTATCAG	-
29	AGAGCAGTGGGTCCAGATGT	AAGACTGGGAGCCTCATGG	-
30	GGGGACTGGAAGGAACAAC	AGATCTGACTCCTGGCCTGA	-
31	GCTTCAGATCCTTCTTGATCCT	GACTCCCACTGCCCTCACT	-
32	CCAGGGAAGTGAGGCTACAG	CCCACAACATTCCAGGTACA	-
33	CCAGGTAGTGCCTGATGAC	CTGGGAGTGGCCATCTGT	-
34-35	AAAAATTTGGGGGATTCTGG	GTGTACATGCTGTGCCTGCT	-
36	CATGGAACCTTGGGAGTACAA	TCTAGCACACCAGCAAGTGG	-
37	CCACTTGCTGGTGTGCTAGA	AGGCAGGTCCATTCTCCAC	-
38	AGCCTTCATCCACAAACAGG	CAGCTTGTGTCTCCAAGCAA	-
39	ATCTGGAGTCCCAGAGAGCA	GAGCGTAGAGTACCGGACCA	-
40	TTGTGGCCTCACCTGTT	GCCATGATGGACACTCAGGT	-
41	TGGGAAAGGGAGACTCAGTG	GAGGCCCTCTTTGTCTTCT	-
42	CAGGGATCCTCAGAAACCAG	GTGCCACAGACTTCCTCAT	-
43	AGGTGCCTTCTCCTGACTCC	CCCAAGTCTAGACCCTCCT	-
44	CGGACAGTACCCACTGAAGC	GGGAGGGGGAGATTCAATAA	-
45	TACAGATGACCCCACTGCTG	CCCATCAGTACCCCTCCTCT	-
46	CTGGTCAGATACCTTCTTGCTG	TCCTCTTGTCTCATCCCTGAA	-
47	CCCCTACCTGTCCAGAGGAT	ATGCCGATGCCAGTCTGTA	-
48	ATAGGTGGAAGGAGGGCATC	GGTGGAGGGAAGATCTGTGA	-
49	CTCTGGGAGTGGGGTATAG	AGGCTCGGGTCAGCATCT	-
50	CACCTCGAGTGGGTCACTG	GTATGGGGTTCCAGGTTCTG	-
51	GGACCCCTTAGTCACAAGA	CTTCCCCCTGGTCTACCC	-
52	CAGTTTTGACCGAAGGGCTA	GTTTGGATGGCAGCAAGAAG	-
53	TCCCATGTGGAAGGATGT	CCCTGCATCACCATTTTA	-
54	TCATATGGCCTTGGAAACACA	TGAAGATCAGGGAGGAGTGG	-
55	GGTTTGGTGGGTCTGAGT	GAACCACAGAGCAGGAAGG	-
56	TGCCCACCCTGTTCTTATGT	ATGGACACAGTGAAGGGATG	-
57	AGGAGGCTCTTGGCACACT	AGTCCCCAAGGGAGAAGCAT	-
58	AGAGAATGCAGTGGGCTCAT	GCCTCCCATTCATTTTGAAC	-
59	GGTCCAGGTGCTCAAGTGTT	AGTACCTGGCTGCAGGAGAC	-
60	ACAGAGGTCAAGCCCAACTG	CCTGACTTGGGCCCTAAAT	-
61	AGATTGGGGTCTGCACACAT	GGAGCCTAGAAGGTCCCAGA	-
62	GTCCCTGCAGCCAAGTG	GCAGGGTTGCCTGTCCAC	-
63	ACAGTGAGGATTGCCTGAGC	AAAGCCCCCTATGATCACCT	-
64	CCATGGCTGTTGTCAGTGAG	GAACAGAGGGTGGCGATG	-
65	GCAGGGTAAGAGTGGTTGA	CCAGTGAGTGAATGTTGGA	-
66	TCTGTACTTCCCACCCAAG	TGAGGCCACACAGTGAGTCT	-

Se emplea MgCl<sub>2</sub> 1,5mM y una temperatura de hibridación de cebadores de 60°C para la PCR de amplificación de los moldes, con excepción para: exón 57, exón 62, fragmento Exón 2 Seg6.3 y fragmento Exón 2 Seg7 donde la temperatura de hibridación ha sido de 62°C.

## 7. Análisis de heterodúplex de ADN en DHPLC para el gen *MYO15A*

Para completar el estudio, se realizaron análisis de heterodúplex de ADN en DHPLC con el objetivo de buscar mutaciones en heterocigosis en individuos afectados en cuya familia no hay antecedentes de sordera (casos esporádicos). En este trabajo, para los análisis en DHPLC del gen *MYO15A* fueron utilizados los mismos productos de amplificación PCR descritos anteriormente, con los mismos cebadores (Tabla 11), empleando las condiciones descritas en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Condiciones para DHPLC para el gen *MYO15A* en casos esporádicos

Exón	Temperatura	Timeshift
2.2	64.6	0.54
2.3	62.0	0.2
2.4	63.9	0.3
1	63.0	0.5
3	63.5	0.2
4	61.8	0.2
5	62.5	0.2
6	59.5	0.2
7	62.8	0.5
8	-	-
9	61.8	0.31
10	62.8	0.21
11	61.2	0.21
12	63.2	0.19
13	58.9	0.39
14	63.9	0.4
15	63.7	0.36
16	61.2	0.34
17	62.5	0.4
18	62.5	0.33
19	61.7	0.36
20	64.5	0.4
21	61.4	0.21
22	61.3	0.28
23	62.7	0.39
24	61.9	0.6
25	61.9	0.31
26	-	-
27	65.0	0.3
28	62.9	0.8
29	62.5	0.27
30	63.1	0.48
31	61.8	0.39
32	62.2	0.5
33	63.4	0.57
34	-	-
35	-	-
36	63.5	0.36
37	63.5	0.28
38	64.8	0.4
39	63.5	0.28
40	63.8	0.27
41	62.4	0.36
42	62.4	0.36
43	64.0	0.2



Exón	Temperatura	Timeshift
44	62.4	0.4
45	61.9	0.3
46	64.0	0.67
47	62.9	0.4
48	61.0	0.4
49	61.0	0.4
50	64.5	0.3
51	63.3	0.18
52	63.2	0.16
53	61.5	0.33
54	62.5	0.4
55	61.4	0.36
56	60.6	0.37
57	63.3	0.39
58	63.6	0.45
59	58.8	0.12
60	62.6	0.46
61	61.5	0.3
62	64.8	0.27
63	63.0	0.33
64	62.4	0.13
65	62.9	0.33

Los exones cuyas condiciones de análisis no figuran en la tabla se estudiaron directamente mediante secuenciación.

## 8. Evaluación de las variantes de secuencia encontradas en *MYO15A* por ensayos de minisequenciación (*SNaPshot*) en individuos control con audición normal

Para verificar las frecuencias de mutaciones missense encontradas en el gen *MYO15A*, se diseñaron ensayos específicos de minisequenciación para cada mutación utilizando como molde el amplificado por PCR del exón donde se localiza la misma (Tabla 13).

**Tabla 13.** Cebadores utilizados en el ensayo de minisequenciación

Mutación	Exón	Cebador <i>SNaPshot</i>
p.Ala1548Thr	Exón 14	AGATCTTCACGCCCCCTAACTGTGGAGAGC
p.Glu1631Lys	Exón 17	ACTGCCTGCAGGAGGAGTACATCCGT
p.Arg1763Trp	Exón 20	CAAGAGCAGCTCCGTCCT
p.Asp2174Asn	Exón 31	ACCCATCAGGTTTGTGTCT
p.Tyr2684His	Exón 43	CATCAATCCCAACTTCTACGGC
p.Ala2739Pro	Exón 45	TGAGGATGAGAGGCTCAGGATGAAG

## *RESULTADOS*

La estrategia seguida para el estudio de los cinco genes incluidos en este trabajo consistió en investigar primero una cohorte de casos familiares, mediante genotipado de marcadores, análisis de haplotipos y secuenciación de exones y fronteras exón/intrón. En caso de encontrarse mutaciones en una proporción relevante de casos, se extendió el estudio a una segunda cohorte compuesta por casos simples (esporádicos, con un solo individuo afectado), mediante análisis de de heterodúplex de ADN en DHPLC.

## 1. Locus DFNB30 (gen *MYO3A*)

Estudiamos 80 familias con hipoacusia neurosensorial no sindrómica de herencia autosómica recesiva. En todas ellas se había descartado previamente la presencia de mutaciones en el locus DFNB1. Todos los individuos de estas familias fueron genotipados para cuatro marcadores microsatélites cercanos al gen *MYO3A* en 10p12 (D10S89, D10S572, D10S111, D10S1775). El análisis de haplotipos indicó compatibilidad de ligamiento a este locus en 18 familias. Se secuenciaron los 35 exones del gen *MYO3A* (y sus correspondientes fronteras exón/intrón) en un individuo afecto de cada una de estas 18 familias. Se encontraron diversos polimorfismos ya descritos (Tabla 14), pero ninguna variante de secuencia patogénica.

**Tabla 14.** SNPs encontrados en el gen *MYO3A* en nuestra serie de pacientes

Localización	cDNA	Proteína	dbSNP cluster ID	Alelos (N=36)
Exón 2	c.-18G>A		rs10128298	1
Exón 3	c.-15A>T		rs11014875	1
Exón 6	c.480G>T	p.Thr160Thr, p.(=)	rs12257119	1
Exón 11	c.956G>A	p.Arg319His	rs3824700	1
Exón 11	c.1042A>G	p.Ile348Val	rs3824699	7
Exón 12	c.1104C>T	p.Tyr368Tyr, p.(=)	rs35379457	14
Exón 12	c.1105G>A	p.Val369Ile	rs3817420	19
Exón 15	c.1559C>T	p.Ala520Val	rs72787346	1
Exón 17	c.1743G>A	p.Glu581Glu, p.(=)	rs41279908	2
Exón 22	c.2497G>T	p.Ala833Ser	rs33947968	7
Exón 26	c.2867G>A	p.Ser956Asn	rs3758449	10
Exón 30	c.3597G>A	p.Glu1199Glu, p.(=)	rs3740232	8
Exón 30	c.3850A>T	p.Thr1284Ser	rs3740231	14
Exón 30	c.3937C>A	p.Arg1313Ser	rs1999240	12
Exón 35	c.4848C>G	p.Ser1616Ser, p.(=)	rs56316209	1

\*número de entrada NCBI del cDNA de *MYO3A*: NM\_017433.4

## 2. Locus DFNB31 (gen *WHRN*)

Estudiamos 81 familias con hipoacusia neurosensorial no sindrómica de herencia autosómica recesiva, en las que se había descartado previamente la presencia de mutaciones en el locus DFNB1. Todos los individuos de estas familias fueron genotipados para los marcadores D9S155, D9S1855, D9S1824 y D9S289, cercanos al gen *WHRN* en 9q32. El análisis de haplotipos reveló compatibilidad con ligamiento en 18 familias. Se secuenciaron los 12 exones del gen *WHRN* (y sus correspondientes fronteras exón/intrón) en un individuo afecto de cada una de estas 18 familias. Se encontraron diversos polimorfismos ya descritos (Tabla 15), pero ninguna variante de secuencia patogénica.

**Tabla 15.** SNPs encontrados en el gen *WHRN* en nuestra serie de pacientes

Localización	cDNA	Proteína	dbSNP cluster ID	Alelos (N=36)
Exón 1	c.117G>A	p.Val39Val, p.(=)	rs2297815	5
Exón 4	c.1091G>A	p.His364His, p.(=)	rs10817610	25
Exón 6	c.1318G>A	p.Ala440Thr	rs4978584	9
Exón 6	c.1353T>C	p.Gly451Gly, p.(=)	rs4979387	19
Exón 8	c.1684C>G	p.Pro562Ala	rs12339210	6
Exón 9	c.1838T>C	p.Met613Thr	rs942519	9
Exón 10	c.2283C>T	p.Ser761Ser, p.(=)	rs34963246	2
Exón 10	c.2348T>C	p.Val783Ala	rs2274159	7
Exón 10	c.2388C>A	p.Asn796Lys	rs2274158	5
Exón10	c.2256C>G	p.Gln752Gln, p.(=)	rs6478078	18

\*número de entrada NCBI del cDNA de *WHRN*: NM\_015404.3

## 3. Locus DFNB37 (gen *MYO6*)

Fueron estudiados 79 casos familiares con hipoacusia neurosensorial no sindrómica de herencia autosómica recesiva, en los que se había excluido previamente la presencia de mutaciones en el locus DFNB1. Todos los individuos de estos casos familiares fueron genotipados para los marcadores microsatélites D6S1589, D6S1622, D6S1031 y D6S1596, cercanos al gen *MYO6* en 6q13. El análisis de haplotipos reveló compatibilidad con ligamiento en 17 familias. Se secuenciaron los 35 exones del gen *MYO6* (y sus correspondientes fronteras exón/intrón) en un individuo afecto de cada una de estas 17 familias. Se encontraron diversos polimorfismos ya descritos (Tabla 16), pero ninguna variante de secuencia patogénica.

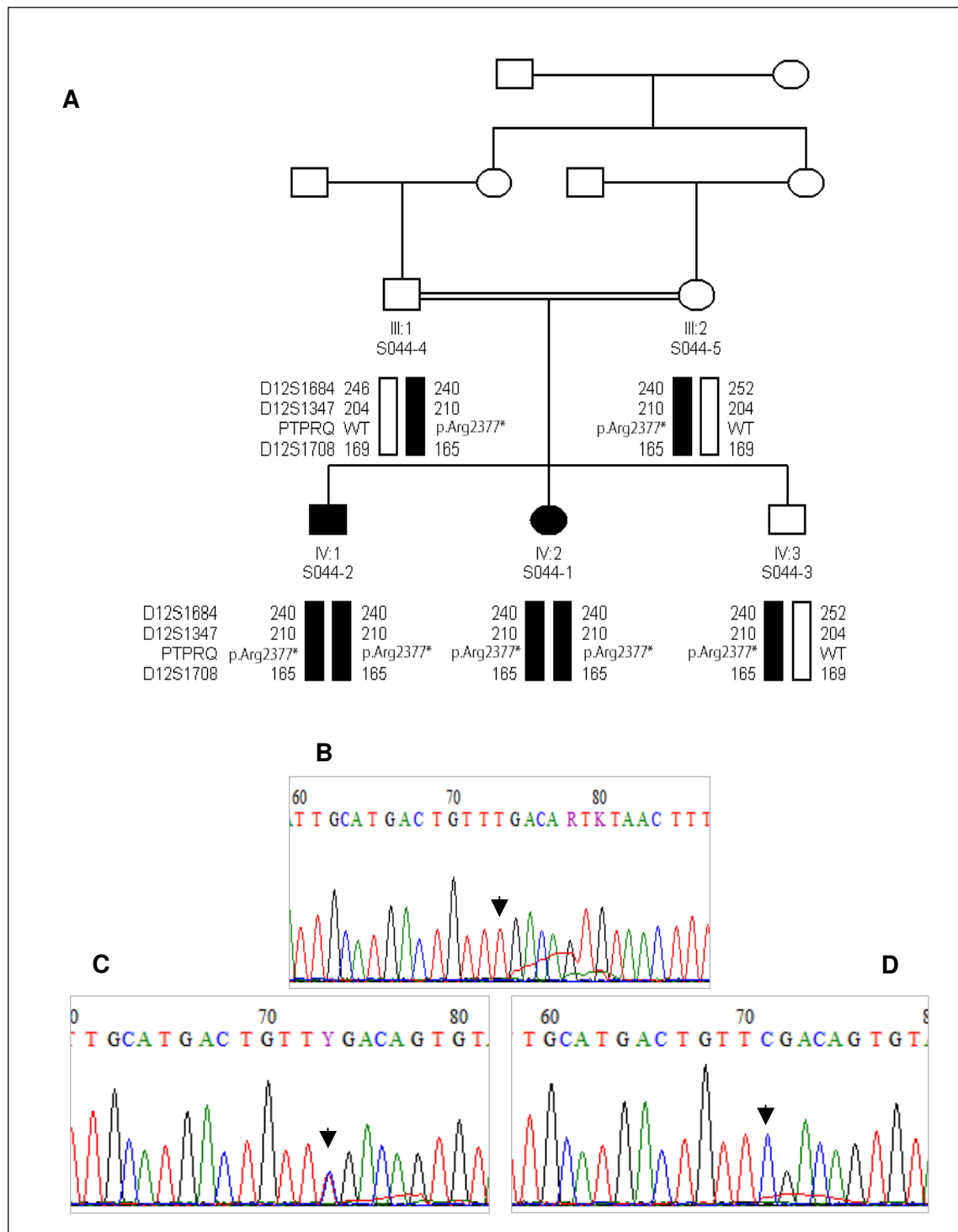
**Tabla 16.** SNPs encontrados en el gen *MYO6* en nuestra serie de pacientes

Localización	cDNA	Proteína	dbSNP cluster ID	Alelos (N=34)
Intrón 4	c.261+73G>A		rs1280052	9
Intrón 9	c.817-21G>A		rs7760587	10
Intrón 7	c.553+11T>C		rs12210963	1
Exón 17	c.1722C>T	p.Asp574Asp, p.(=)	rs11756446	4
Intrón 20	c.2077+96T>A		rs9443195	4
Intrón 25	c.2658+17C>T		rs2295936	3
Intrón 29	c.3138-107T>A		rs720862	4
Intrón 31	c.3280+86A>G		rs12193523	3
Intrón 31	c.3281-30delT		rs11285982	8

\*número de entrada NCBI del cDNA de *MYO6*: NM\_004999.3

#### 4. Locus DFNB84 (gen *PTPRQ*)

Hemos investigado 81 casos familiares con hipoacusia neurosensorial no sindrómica de herencia autosómica recesiva, en los que se había excluido previamente la presencia de mutaciones en el locus DFNB1. Todos los individuos de estas familias fueron genotipados para los marcadores microsatélites D12S1684, D12S1347 y D12S1708, localizados próximos al gen *PTPRQ*, en el locus DFNB84, en 12q21. El análisis de haplotipos mostró compatibilidad con ligamiento en 21 familias. Se secuenciaron los 58 exones del gen *PTPRQ* (y sus correspondientes fronteras exón/intrón) en un individuo afecto de cada una de ellas. Encontramos una nueva mutación que genera un codón de parada prematuro (Figura 8, Tabla 17), además de diversos polimorfismos ya descritos (Tabla 18). La nueva mutación, hallada en una familia consanguínea de origen gitano, reside en el exón 55. Dada la existencia de cuatro diferentes ARNs mensajeros que combinan diferentes exones del gen, la numeración de la mutación a nivel de cDNA y de proteína es variada (Tabla 17). Hay que destacar que la mutación afecta a todas las diferentes especies de ARNm de *PTPRQ*. La mutación segrega consistentemente con la hipoacusia en la familia: los dos hijos afectados son homocigotos, mientras que los padres y hermano normoyentes son heterocigotos (Figura 8).



**Figura 8. A.** Análisis de haplotipos de la familia S044, para los tres marcadores microsatélites. **B-D.** Secuencias del exón 55 del gen *PTPRQ* para la mutación p.Arg2377\*. **B:** Mutación en homocigosis en el individuo IV:1 **C:** Mutación en heterocigosis en el individuo IV:3. **D:** Alelo silvestre. Las flechas señalan la posición c.7129. La nomenclatura utilizada se basa en el transcrito de la isoforma III de *PTPRQ* (Schraders et al., 2010).

**Tabla 17.** Nomenclatura de la mutación en el gen *PTPRQ* encontrada en nuestro estudio

Isoforma	Tamaño ORF (bp)	Proteína (# AA)	Mutación	
			cDNA	Proteína
I	6600	2200	c.6178C>T	p.Arg2060*
II	7761	2587	c.7339C>T	p.Arg2447*
III	7551	2517	c.7129C>T	p.Arg2377*
IV	7503	2501	c.7081C>T	p.Arg2361*

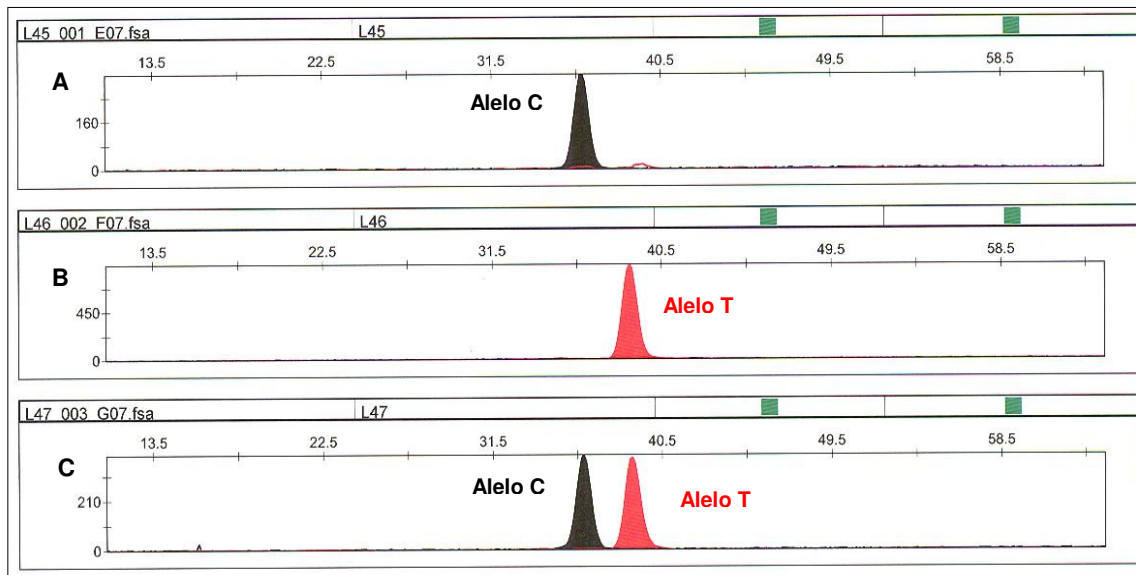
Nomenclatura de la mutación en *PTPRQ* para sus transcritos alternativos y sus correspondientes isoformas. Hay cuatro isoformas distintas, que contienen un número variable de dominios de tipo 3 de la fibronectina (FN3), dominios transmembranares y dominios fosfatasa.

**Tabla 18.** SNPs encontrados en el gen *PTPRQ* en nuestra serie de pacientes

Localización	cDNA	Proteína	dbSNP cluster ID	Alelos (N=42)
Exón 15	c.752C>T	p.Thr251Ile	rs78857302	2
Exón 21	c.1758A>G	p.Thr586Thr	rs61729291	6
Exón 28	c.3025C>A	p.Gln1009Lys	rs11114486	14
Exón 29	c.3159C>G	p.Leu1053Leu	rs12824064	21
Exón 29	c.3110T>G	p.Val1037Gly	rs7965277	7
Exón 34	c.3820T>C	p.Phe1274Leu	rs6539524	12
Exón 34	c.3840C>T	p.Tyr1280Tyr	rs61729275	1
Exón 35	c.4258A>G	p.Asn1420Asp	rs17713202	3
Exón 35	c.4314C>T	p.Ala1438Ala	rs11114503	3
Exón 42	c.5729T>C	p.Ile1910Thr	rs7963963	2
Exón 48	c.6555C>T	p.Asp2185Asp	rs61729309	1

\* La nomenclatura utilizada se basa en el transcrito de la isoforma III de *PTPRQ* (Schraders et al., 2010).

Dado que habíamos encontrado la mutación p.Arg2377\* en una familia de origen gitano, decidimos investigar la presencia de la mutación en otras familias con hipoacusia neurosensorial no sindrómica de herencia autosómica recesiva y de etnia gitana de nuestra colección. Para ello, pusimos a punto un *test* de minisecuencia para la mutación (Figura 9). Se investigó el caso índice de cada familia de un total de 45 familias. No se encontró la mutación en ningún caso.



**Figura 9.** Ensayo de minisequenciación para la mutación p.Arg2377\*. **A.** Control silvestre. **B.** Homocigoto mutante para la mutación. **C.** Heterocigoto para la mutación.

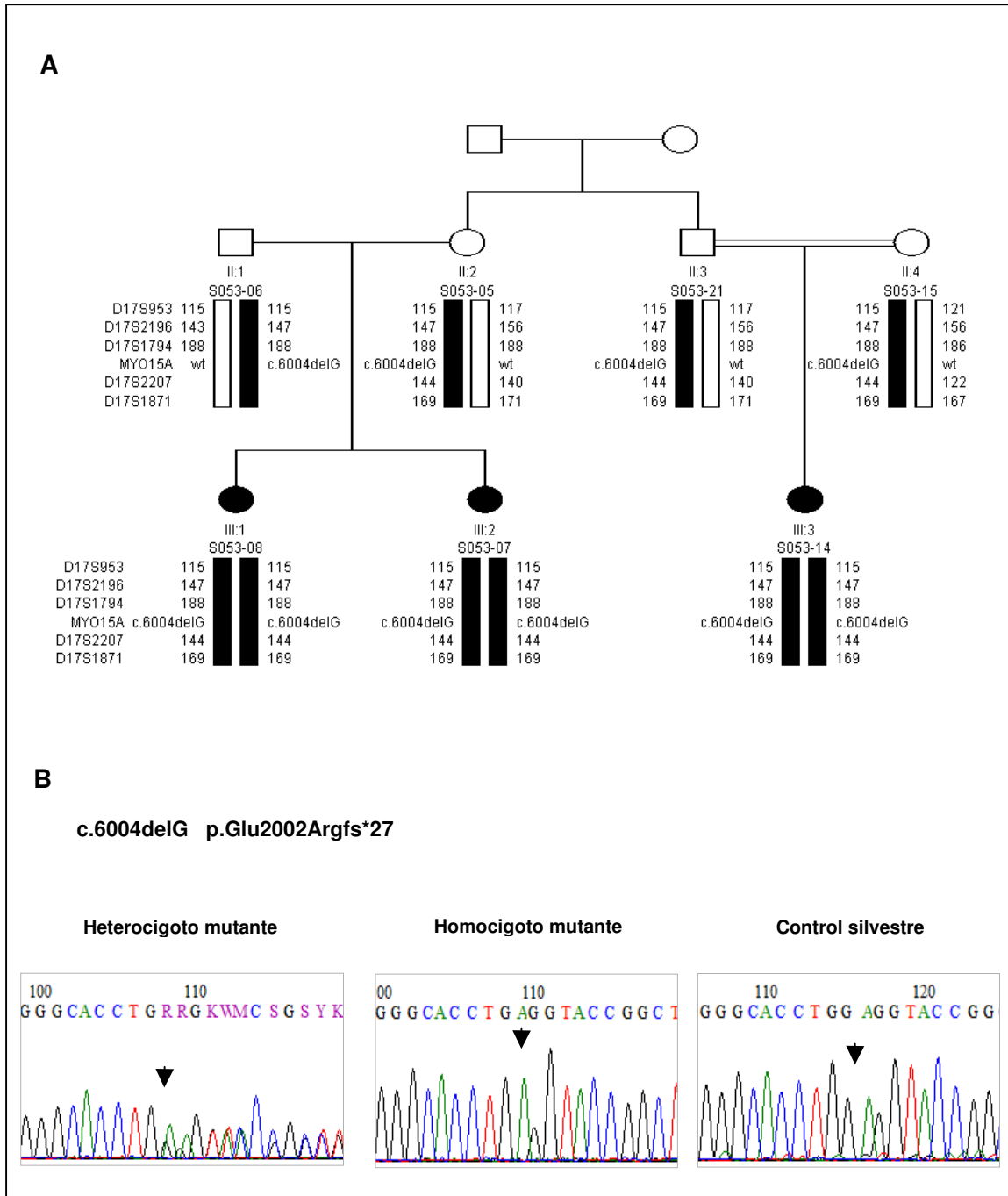
## 5. Locus DFNB3 (gen *MYO15A*)

### 5.1 Estudio de casos familiares españoles

Estudiamos 89 casos familiares con hipoacusia neurosensorial de herencia autosómica recesiva. En todos los casos se había excluido la presencia de mutaciones en el locus DFNB1. Todos los individuos de estas familias fueron genotipados para los microsatélites D17S953, D17S2196, D17S1794, D17S1871 y D17S2207, localizados próximos al gen *MYO15A*, en el locus DFNB3, en 17p11.2. El análisis de haplotipos mostró compatibilidad con ligamiento en 23 familias. Sobre el caso índice de cada una de ellas se procedió a la búsqueda de mutaciones mediante amplificación por PCR y secuenciación de los 66 exones del gen *MYO15A* y sus correspondientes fronteras exón/intrón. Los datos de secuencia obtenidos permitieron aclarar la causa de la hipoacusia en 5 familias. En total, encontramos 7 nuevas mutaciones patogénicas en el gen *MYO15A*: 3 mutaciones que crean codones de parada prematuros (directamente o como consecuencia de un cambio de fase de lectura) y 4 mutaciones de sustitución de aminoácido (*missense*).

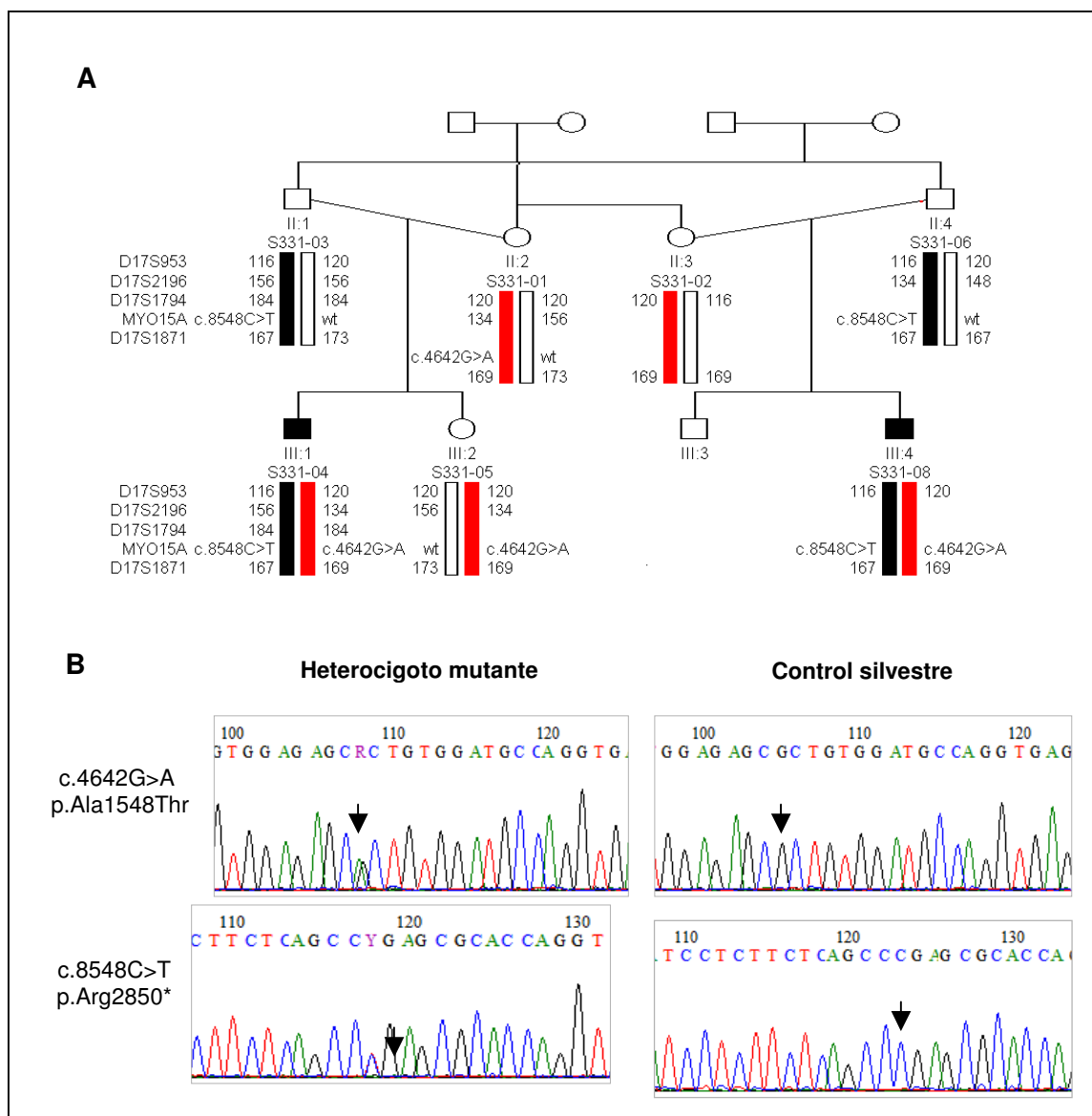


En la familia **S053** (Figura 10) encontramos en el exón 27 la mutación c.6004delG, que provoca un cambio de fase de lectura, lo que genera un codón de parada prematuro (p.Glu2002Argfs\*27). Todos los individuos afectados de la familia son homocigotos para la mutación, mientras que sus progenitores son heterocigotos portadores.



**Figura 10.** Familia S053. **A.** Análisis de haplotipos. **B.** Electroferogramas de las secuencias con la mutación p.Glu2002Argfs\*27 en el gen *MYO15A*.

En la familia **S331** (Figura 11) encontramos las mutaciones c.4642G>A (exón 14) y c.8548C>T (exón 48), en heterocigosis compuesta en los dos individuos afectados. Sus progenitores son heterocigotos portadores. La mutación c.8548C>T genera un codón de parada prematuro (p.Arg2850\*). Por su parte, la mutación c.4642G>A provoca una sustitución de aminoácido (p.Ala1548Thr), que afecta a un residuo muy conservado del dominio motor de la proteína (Tabla 19). Las puntuaciones en los programas de predicción de los efectos de las mutaciones (Polyphen, SIFT) le atribuyen una clara patogenicidad (Tabla 19). Mediante un ensayo de minisequenciación específico para la mutación p.Ala1548Thr (Figura 12), se observó la ausencia de la mutación en 50 individuos control con audición normal.



**Figura 11.** Familia S331. **A.** Análisis de haplotipos. **B.** Electroferogramas de las secuencias con las mutaciones p.Ala1548Thr y p.Arg2850\* en el gen *MYO15A*.

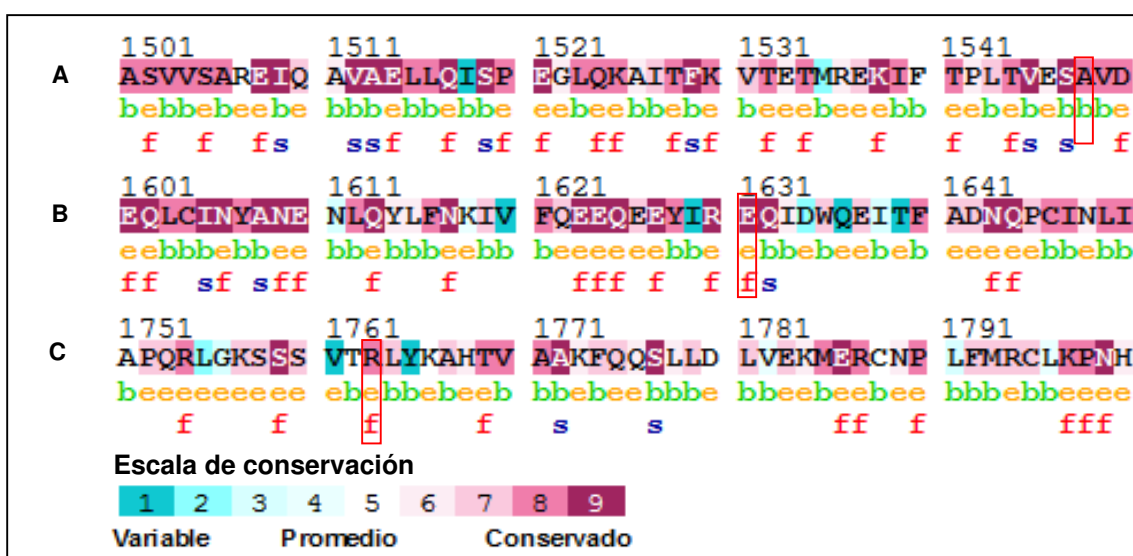


**Figura 12.** Ensayo de minisequenciación para la detección de la mutación c.4642G>A (p.Ala1548Thr). Se muestra un individuo heterocigoto para la mutación.

Los resultados obtenidos utilizando el programa **Conseq** para determinar el índice de conservación del aminoácido mutado en las mutaciones *missense*, así como los resultados de los análisis *in silico* utilizando los programas **Polyphen** y **SIFT** para valorar el posible efecto patogénico de la mutación sobre la proteína, están detallados a continuación (Tabla 19).

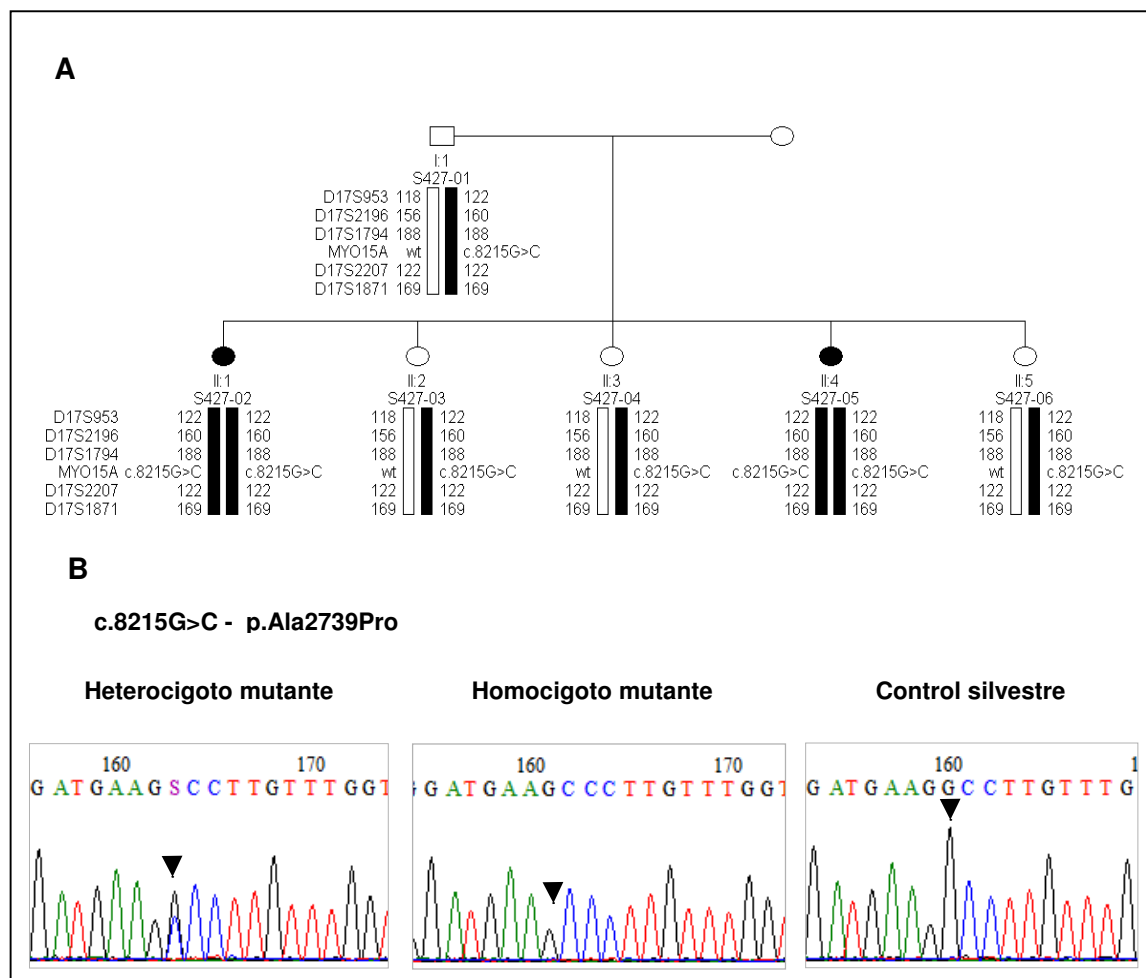
**Tabla 19.** Valores **Conseq**, **SIFT** y **Polyphen** de las mutaciones missense encontradas en este trabajo

cDNA	Proteína	Dominio	Conseq	Polyphen	SIFT	Cromosomas controles
c.4642G>A	p.Ala1548Thr	Motor	8	0.962	0	0/100
c.4891G>A	p.Glu1631Lys	Motor	9	0.962	0	0/100
c.5287C>T	p.Arg1763Trp	Motor	8	1	0.1	0/100
c.6520G>A	p.Asp2174Asn	MyTH4	9	0.981	0	0/100
c.8050T>C	p.Tyr2684His	FERM	9	0.996	0	1/100
c.8215G>C	p.Ala2739Pro	FERM	7	0.981	0.22	0/100

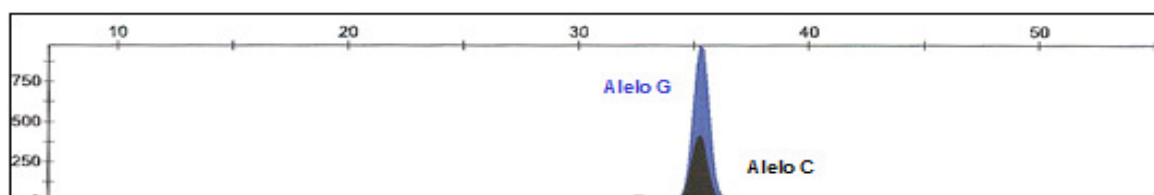


**Figura 13.** Ejemplo de Conseq para los residuos afectados por tres de las mutaciones encontradas en este estudio. **(A)** mutación p.Ala1548Thr, **(B)** mutación p.Glu1631Lys y **(C)** Mutación p.Arg1763Trp. Leyenda: **b** - residuo escondido, **e** - expuesto, **f** - funcional (expuesto con alta conservación), **s** - estructural (escondido con alta conservación).

En la familia **S427** (Figura 14) encontramos en el exón 45 la mutación c.8215G>C, que provoca una sustitución de aminoácido (p.Ala2739Pro), que afecta a un residuo conservado del primer dominio FERM de la proteína. La puntuación en el programa Polyphen indica patogenicidad clara (Tabla 19). La puntuación SIFT, por el contrario, sugiere una patogenicidad menos marcada. La mutación segrega con la hipoacusia en la familia (los individuos afectados son homocigotos, los individuos normoyentes son heterocigotos). Mediante un ensayo de minisequenciación específico (Figura 15), se observó la ausencia de la mutación en 50 individuos control con audición normal.

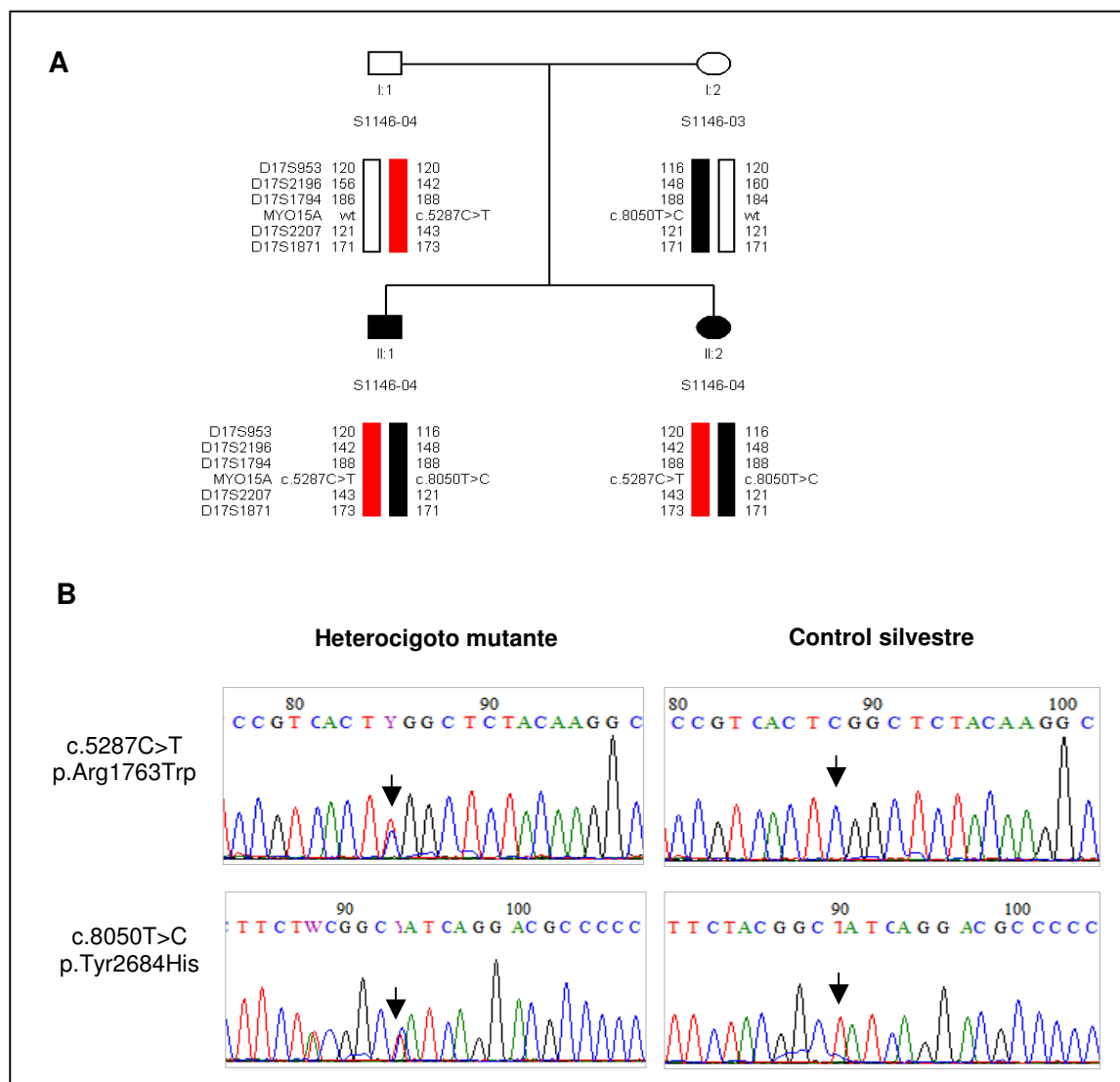


**Figura 14.** Familia S427. **A.** Análisis de haplotipos. **B.** Electroferogramas de las secuencias con la mutación c.8215G>C (p.Ala2739Pro) en el gen MYO15A.

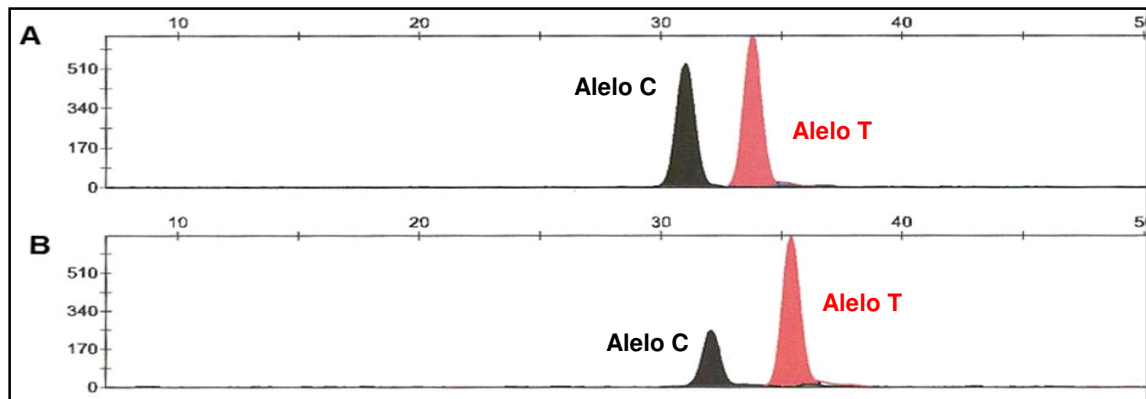


**Figura 15.** Ensayo de minisequenciación para la detección de la mutación c.8215G>C (p.Ala2739Pro). Se muestra un individuo heterocigoto para la mutación.

En la familia **S1146** (Figura 16) encontramos las mutaciones c.5287C>T (exón 20) y c.8050T>C (exón 43), en heterocigosis compuesta en los dos individuos afectados. Sus progenitores son heterocigotos portadores. La mutación c.5287C>T provoca una sustitución de aminoácido (p.Arg1763Trp), que afecta a un residuo muy conservado del dominio motor de la proteína (Tabla 19). Las puntuaciones en los programas Polyphen y SIFT le atribuyen una clara patogenicidad (Tabla 19). Por su parte, c.8050T>C también provoca una sustitución de aminoácido (p.Tyr2684His), la cual afecta a un residuo muy conservado del primer dominio FERM de la proteína (Tabla 19). Mediante ensayos de minisequenciación específicos (Figura 17), se observó la ausencia de la mutación p.Arg1763Trp en 50 individuos control con audición normal. Mediante ensayos de minisequenciación (Figura 17), la mutación p.Tyr2684His fue encontrada en un único alelo del total de 100 cromosomas analizados.

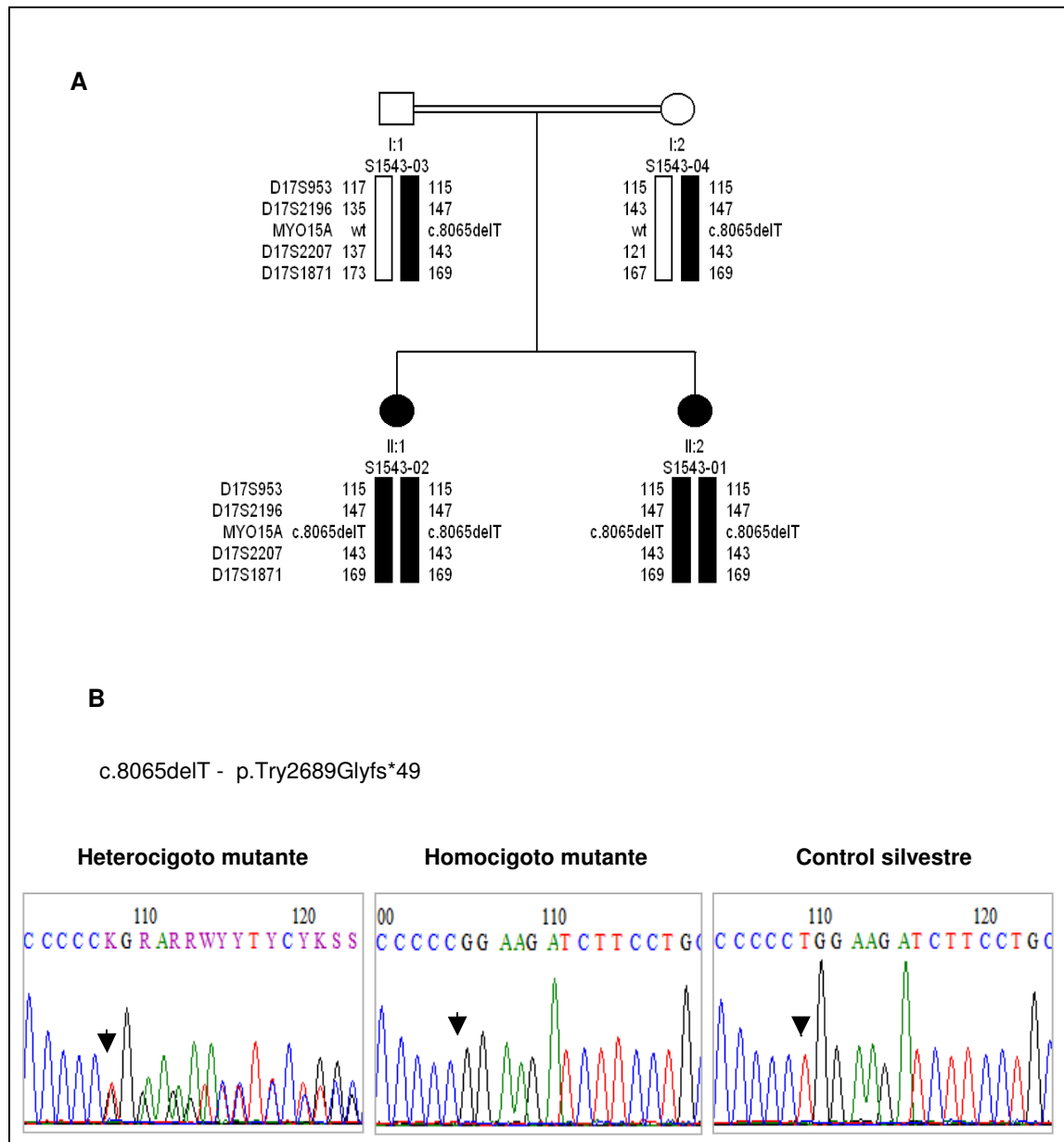


**Figura 16.** Familia S1146. **A.** Análisis de haplotipos. **B.** Electroferogramas de las secuencias con las mutaciones: c.5287C>T (p.Arg1763Trp) y c.8050T>C (p.Tyr2684His) en el gen *MYO15A*.



**Figura 17. A.** Ensayo de minisequenciación para la detección de la mutación c.5287C>T (p.Arg1763Trp). **B.** Ensayo de minisequenciación para la detección de la mutación c.8050T>C (p.Tyr2684His). Se muestra un individuo heterocigoto para cada mutación.

Finalmente, en la familia **S1543** (Figura 18) encontramos en el exón 43 la mutación c.8065delT, que provoca un cambio de fase de lectura, lo que genera un codón de parada prematuro (p.Trp2689Glyfs\*49). Los dos individuos afectados de la familia son homocigotos para la mutación, mientras que sus progenitores son heterocigotos portadores.

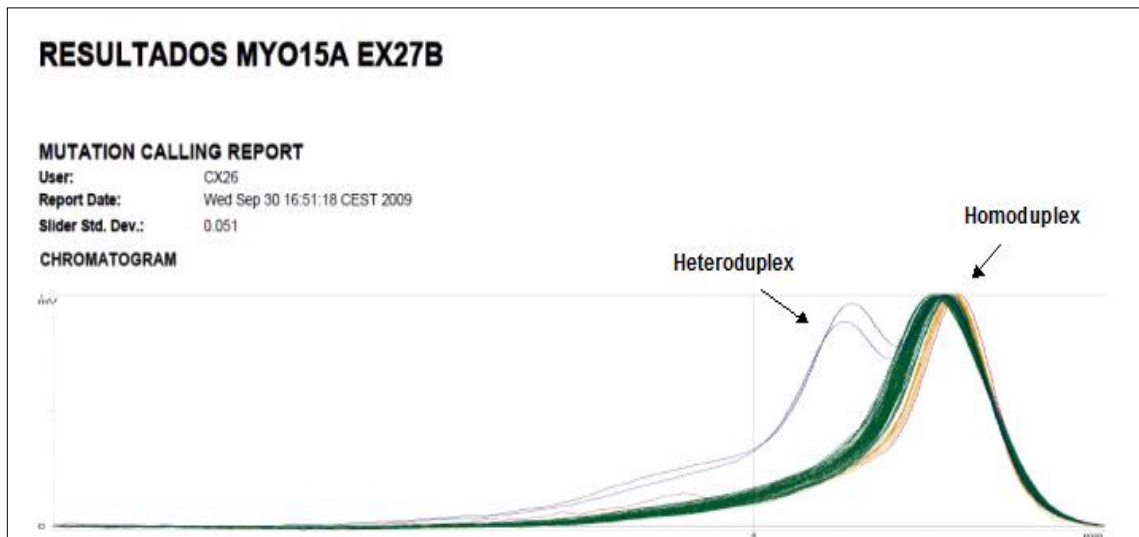


**Figura 18.** Familia S1543. **A.** Análisis de haplotipos. **B.** Electroferogramas de las secuencias con la mutación c.8065delT (p.Trp2689Glyfs\*49) en el gen *MYO15A*.

## 5.2 Estudio de casos esporádicos españoles

El hallazgo de un número relativamente elevado de casos con mutaciones en *MYO15A* en la cohorte de casos familiares, nos animó a extender nuestro estudio a una cohorte de casos esporádicos, es decir, con un único individuo afecto en la familia.

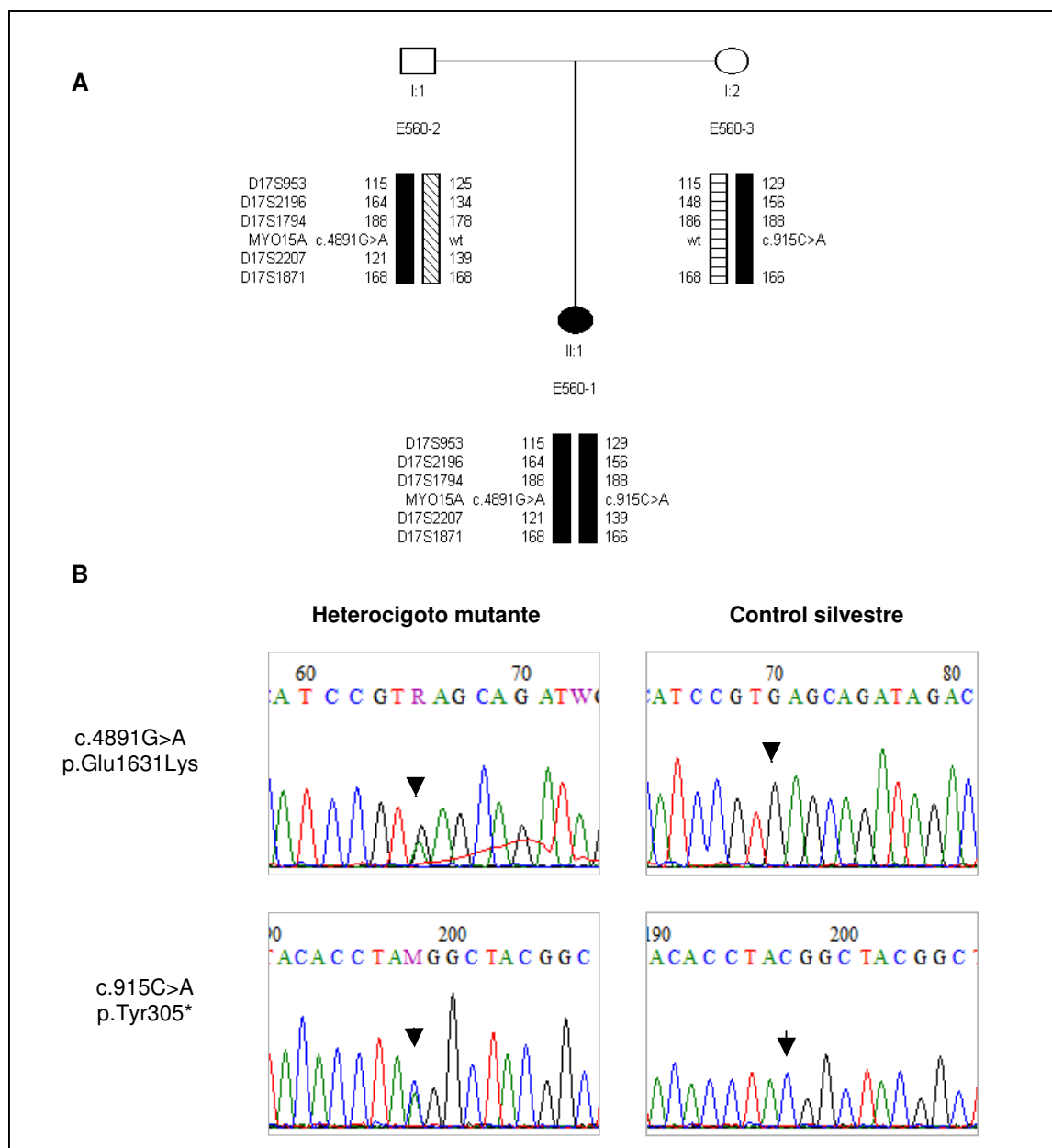
Para ello, realizamos análisis de heterodúplex de ADN en *DHPLC* de todos los amplicones que cubren los 66 exones del gen, amplicón por amplicón. En la Figura 19 se muestra un ejemplo de los perfiles de elución de DHPLC obtenidos en los análisis de heterodúplex. Investigamos una cohorte de 80 casos esporádicos. El análisis de heterodúplex seguido de secuenciación permitió aclarar la causa de la hipoacusia en 4 de estos casos. En total, encontramos 8 mutaciones patogénicas en el gen *MYO15A*: 4 mutaciones que crean codones de parada prematuros (directamente o como consecuencia de un cambio de fase de lectura), 2 mutaciones de sustitución de aminoácido (*missense*), 1 delección en fase de seis nucleótidos que genera la pérdida de dos aminoácidos en la proteína y 1 mutación de sitio de corte y empalme (*splicing*).



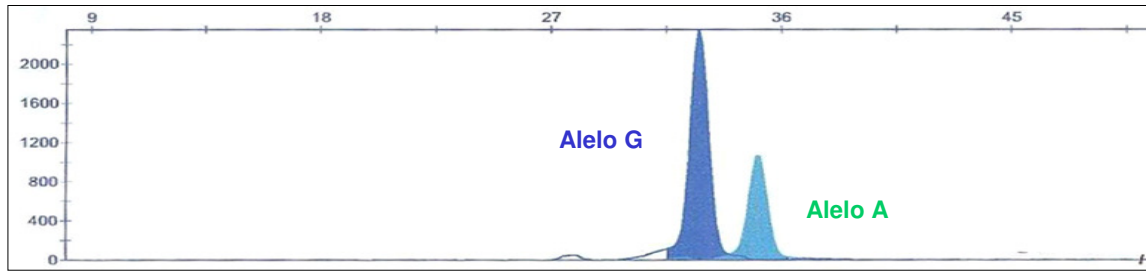
**Figura 19.** Ejemplo de perfil de elución de DHPLC obtenido para el amplicón correspondiente al exón 27 que contiene la mutación p.Glu2002Argfs\* en el gen *MYO15A*. Los picos en azul corresponden a heterodúplex, que revelan heterocigosis para la mutación, mientras que los homodúplex son representados en verde. En este gráfico se muestran los perfiles de dilución de 48 individuos, dos de los cuales muestran heterodúplex.



En el caso **E560** (Figura 20) encontramos las mutaciones c.915C>A (exón 2) y c.4891G>A (exón 17), en heterocigosis compuesta en el individuo afectado. Sus progenitores son heterocigotos portadores. La mutación c.915C>A genera un codón de parada prematuro (p.Tyr305\*). Por su parte, la mutación c.4891G>A provoca una sustitución de aminoácido (p.Glu1631Lys), que afecta a un residuo muy conservado del dominio motor de la proteína (Tabla 19). Las puntuaciones en los programas Polyphen y SIFT le atribuyen una clara patogenicidad (Tabla 19). Mediante un ensayo de minisequenciación específico para la mutación p.Glu1631Lys (Figura 21), se observó la ausencia de la mutación en 50 individuos control con audición normal.

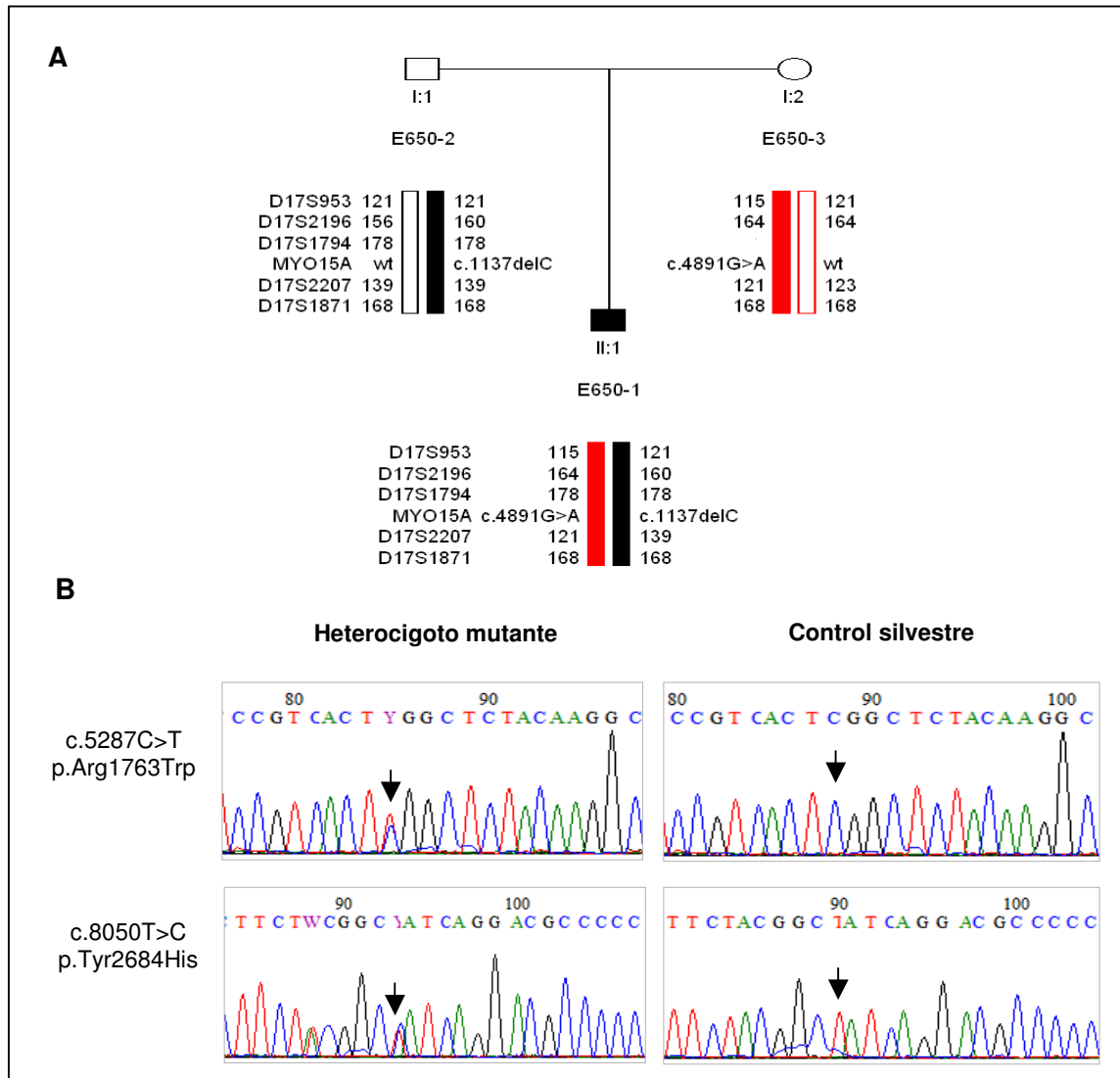


**Figura 20.** Familia E560. **A.** Análisis de haplotipos. **B.** Electroferogramas de las secuencias con las mutaciones: c.4891G>A (p.Glu1631Lys) y c.915C>A (p.Tyr305\*) en el gen *MYO15A*.



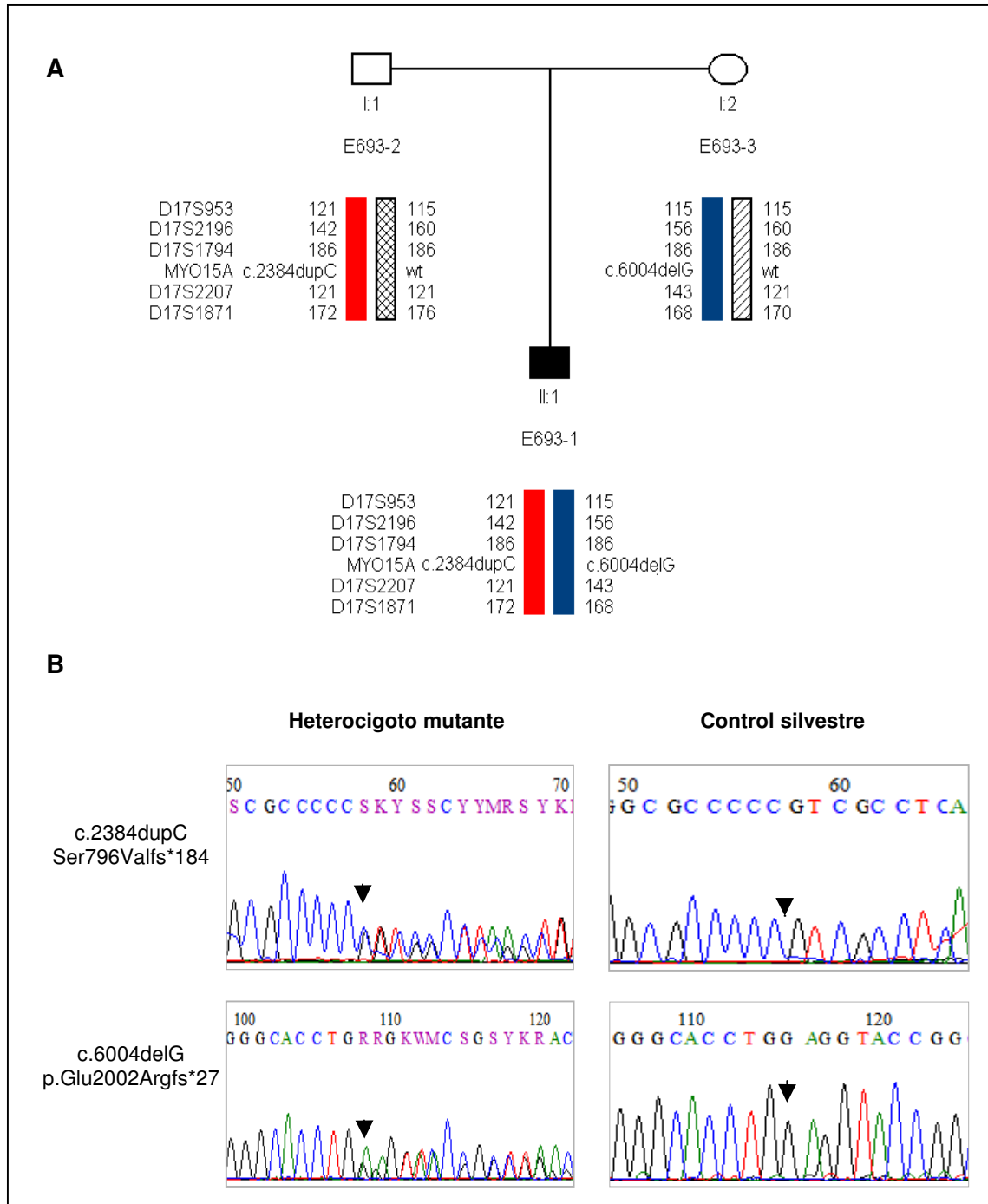
**Figura 21.** Ensayo de minisequenciación para la detección de la mutación c.4891G>A (p.Glu1631Lys). Se muestra un individuo heterocigoto para la mutación.

En el caso **E650** (Figura 22) encontramos las mutaciones c.1137delC (exón 2) y c.4891G>A (exón 17), en heterocigosis compuesta en el individuo afectado. Sus progenitores son heterocigotos portadores. La mutación c.1137delC provoca un cambio de fase de lectura, lo que genera un codón de parada prematuro (p.Tyr380Metfs\*64). Los efectos de la otra mutación, c.4891G>A, ya se han discutido en el caso E560.



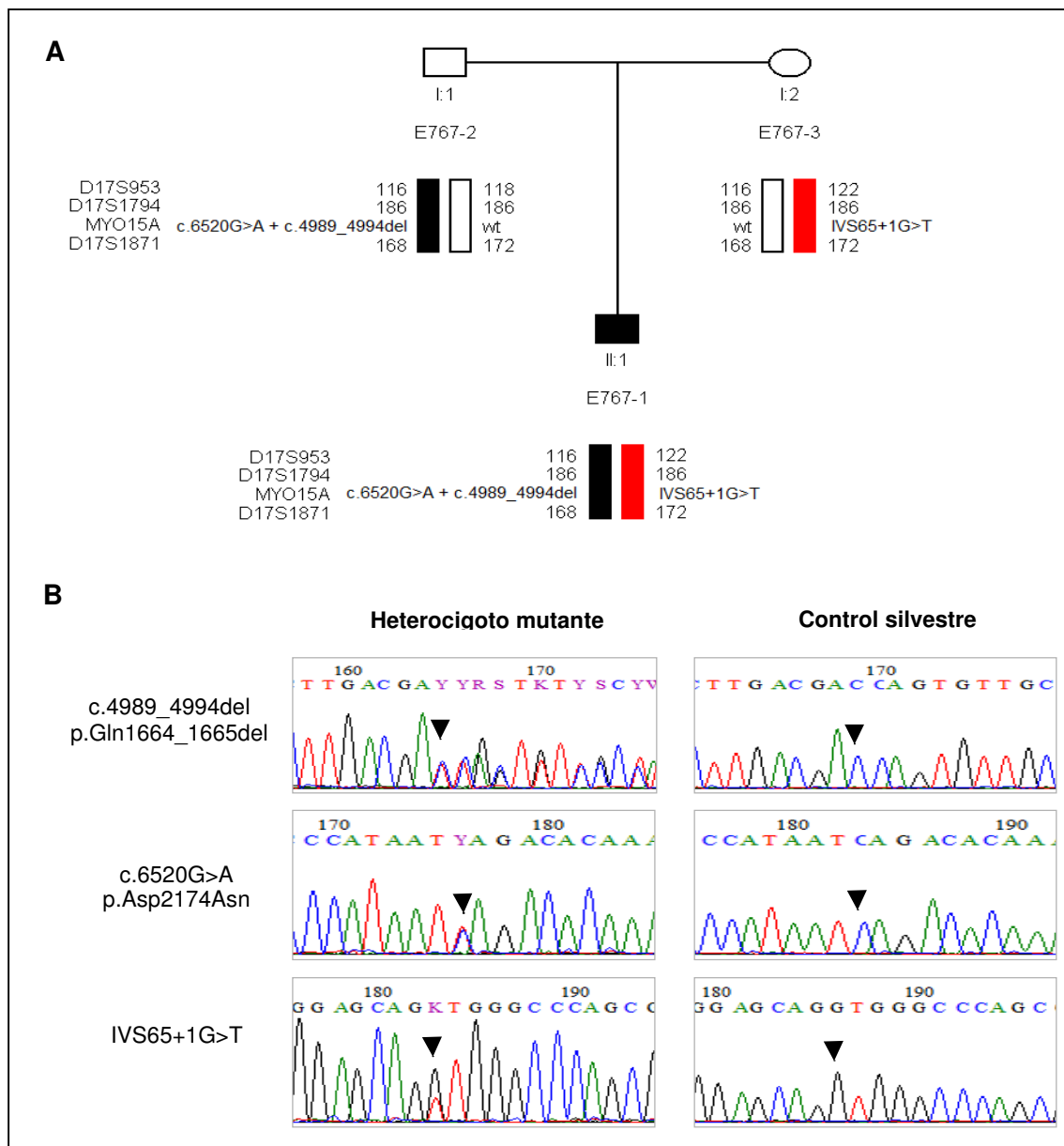
**Figura 22.** Familia E650. **A.** Análisis de haplotipos. **B.** Electroferogramas de las secuencias con las mutaciones: c.1137delC (p.Tyr380Metfs\*64) y c.4891G>A (p.Glu1631Lys) en el gen *MYO15A*.

En el caso **E693** (Figura 23) encontramos las mutaciones c.6004delG (ya identificada en nuestro caso familiar S053) y c.2384dupC (exón 2), en heterocigosis compuesta en el individuo afectado. Sus progenitores son heterocigotos portadores. La mutación c.2384dupC provoca un cambio de fase de lectura, lo que genera un codón de parada prematuro (p.Ser796Valfs\*184).

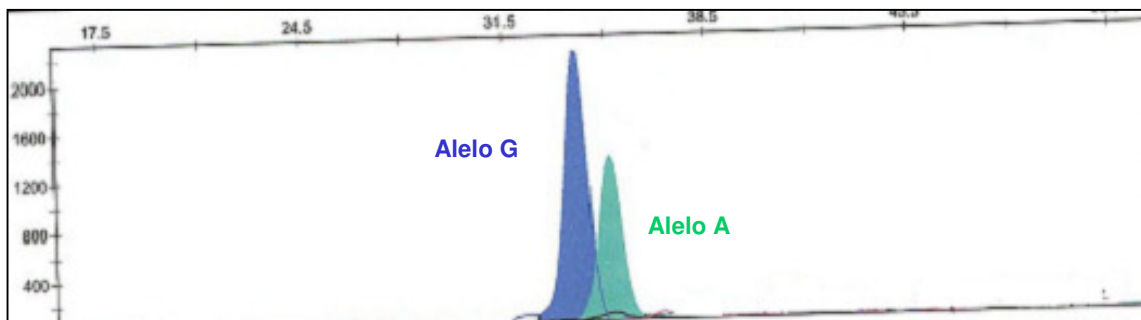


**Figura 23.** Familia E693. **A.** Análisis de haplotipos. **B.** Electroferogramas de las secuencias con las mutaciones c.2384dupC (p.Ser796Valfs\*184) y c.6004delG (p.Glu2002Argfs\*27) en el gen *MYO15A*.

En el caso **E767** (Figura 24) encontramos las mutaciones c.4989\_4994del (exón 17) en *cis* con la mutación c.6520G>A (exón 31) y IVS65+1G>T (exón 65), en heterocigosis compuesta en el individuo afectado. Sus progenitores son heterocigotos portadores. La delección c.4989\_4994del tiene como consecuencia la pérdida de dos aminoácidos en el dominio motor. La mutación c.6520G>A se encuentra en el dominio MyTH4. Mientras que la mutación IVS65+1G>T consiste en el cambio de una G a una T en el sitio donador del splicing del RNA. Mediante un ensayo de minisequenciación específico para la mutación c.6520G>A (Figura 25), se observó la ausencia de la mutación en 50 individuos control con audición normal.



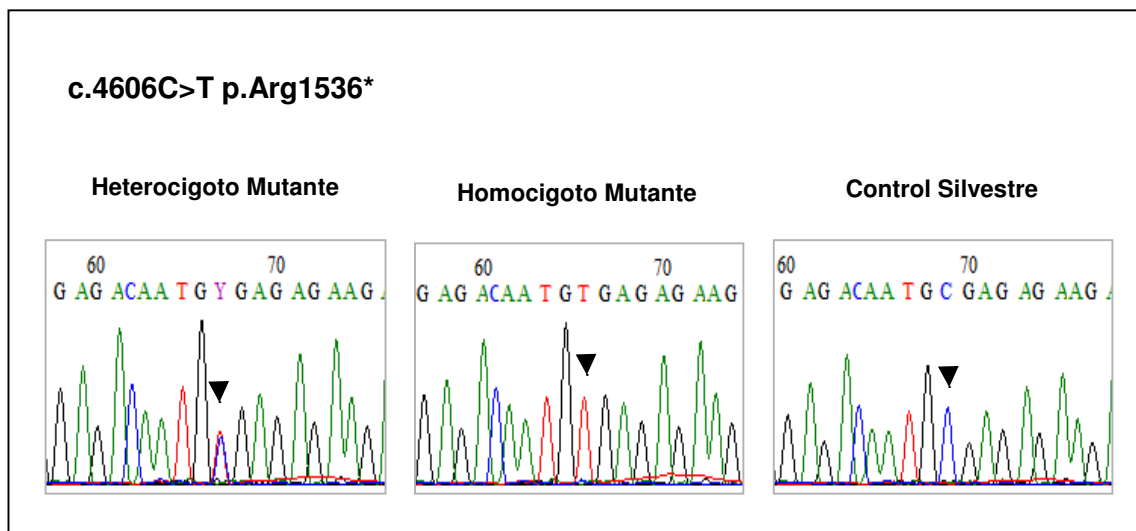
**Figura 24.** Familia E767. **A.** Análisis de haplotipos. **B.** Electroferogramas de mutaciones c.4989\_4994del (p.Gln1664\_1665del), c.6520G>A (p.Asp2174Asn) y IVS65+1G>T en el gen *MYO15A*. Los Electroferogramas para la mutación c.6520G>A representan la secuencia inversa.



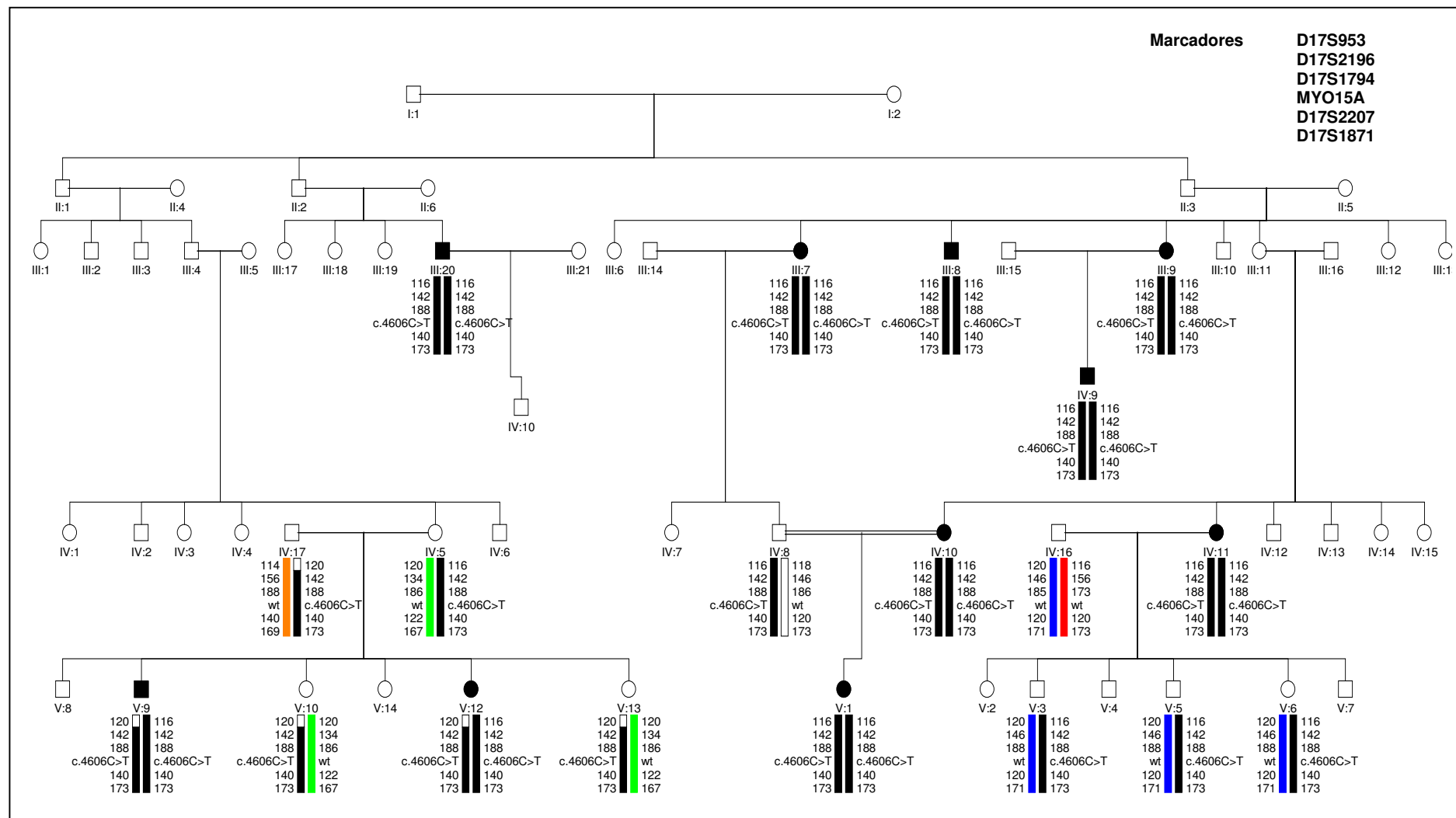
**Figura 25.** Ensayo de minisequenciación para la detección de la mutación c.6520G>A (p.Asp2174Asn). Se muestra un individuo heterocigoto para la mutación.

### 5.3 Familia Brasileña

Incluimos en el estudio una familia de Brasil que manifestaba una sordera neurosensorial no sindrómica, prelocutiva y profunda de herencia autosómica recesiva (Figura 27). La familia proviene de la Villa de Fortalezinha, ubicada en la Isla de Maiandeuá, en la costa atlántica del estado de Pará en el norte de Brasil. Los estudios de haplotipos por microsatélites mostraban compatibilidad de ligamiento a *DFNB3*. La secuenciación del gen *MYO15A* permitió la identificación de una nueva mutación *nonsense* (c.4606C>T). La mutación se encuentra en el exón 14 (Figura 26).



**Figura 26.** Electroferogramas de la mutación p.Arg1536\* en el gen *MYO15A* en el caso de la familia de Brasil.



**Figura 27.** Análisis de haplotipos para el gen *MYO15A* en la familia brasileña.

En la tabla 20 se recogen todos los genotipos del gen *MYO15A* observados en los individuos estudiados en este trabajo, así como algunos datos clínicos sobre su hipoacusia. En la tabla 21 se muestran los polimorfismos encontrados en este estudio, tanto nuevos (no descritos) como ya recogidos en las bases de datos (NCBI y Ensemble)

**Tabla 20.** Genotipos observados en nuestra muestra

Caso	Tipo	Genotipo	Gravedad de la hipoacusia
S053	Familiar	p.Glu2002Arg fs*27 + p.Glu2002Arg fs*27	Profunda
S331	Familiar	p.Ala1548Thr + p.Arg2850*	Profunda
S427	Familiar	p.Ala2739Pro + p.Ala2739Pro	Moderada/graves Severa/agudos
S1146	Familiar	p.Arg1763Trp + p.Tyr2684His	Profunda
S1543	Familiar	p.Trp2689Glyfs*49 + p.Trp2689Glyfs*49	Bilateral Profunda congenita
Brasil	Familiar	p.Arg1536* + p.Arg1536*	Profunda
E560	Esporádico	p.Glu1631Lys + p.Tyr305*	Bilateral Profunda prelocutiva
E650	Esporádico	p.Tyr380Metfs*64 + p.Glu1631Lys	Profunda
E693	Esporádico	p.Glu2002Argfs*27 + p.Ser796Valfs*184	Moderada
E767	Esporádico	IVS65+1 G>T + p.Gln1664_Cys1665del + p.Asp2174Asn	Profunda

**Tabla 21.** Listado de polimorfismos encontrados en la región codificante del gen *MYO15A* en nuestra serie de pacientes

Localización	cDNA	Proteína	dbSNP cluster ID	Alelos (N=78)
Exón 17	c.4954C>T	p.Leu1652Leu	rs2280777	20
Exón 17	c.4976G>A	p.Arg1659Gln	rs141473928	1
Exón 24	c.5754T>G	p.Ile1918Met	rs150403702	1
Exón 25	c.5880 C>T	p.His1960His	<a href="#">Este trabajo</a>	1
Exón 26	c.5929T>C	p.Cys1977Arg	rs854777	32
Exón 28	c.6052G>A	p.Gly2018Arg	rs2272571	7
Exón 29	c.6186 G>	p.Ala2062Ala	<a href="#">Este trabajo</a>	1
Exón 30	c.6485C>T	p.Pro2162Leu	rs111948619	1
Exón 35	c.7185T>C	p.Phe2395Phe	rs2955379	28
Exón 41	c.7857G>A	p.Gly2619Gly	rs854772	30
Exón 43	c.8045A>T	p.Tyr2682Phe	rs712270	15
Exón 46	c.8322C>T	p.Ser2774Ser	rs17655870	18
Exón 52	c.9072 G>A	p.Glu3024Glu	<a href="#">Este trabajo</a>	1
Exón 57	c.9486C>T	p.Asp3162Asp	rs8077577	12
Exón 60	c.9754A>G	p.Asn3252Asp	rs147458358	1
Exón 63	c.10182G>A	p.Ala3394Ala	<a href="#">Este trabajo</a>	1
Exón 65	c.10431T>C	p.Tyr3477Tyr	rs854800	34

\*número de entrada NCBI del cDNA de *MYO15A*: NM\_016239.3



*DISCUSIÓN*

La elevada heterogeneidad genética de las hipoacusias dificulta el diagnóstico genético-molecular de estos trastornos. El elevado coste que supone estudiar todos los genes identificados hasta el momento hace necesario concentrar los esfuerzos sobre aquellos genes en los que suelen encontrarse mutaciones con mayor frecuencia, lo que implica cierto conocimiento de la epidemiología genética de la población en estudio (Hilgert et al., 2009; Rabionet et al., 2000). En la mayoría de laboratorios, el diagnóstico que se ofrece solamente incluye el *locus* DFNB1 (gen *GJB2* y deleciones que implican o no al gen *GJB6*) en hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas. Esto es debido a que las mutaciones en estos genes son bastante frecuentes, dando cuenta de hasta un 50% de los casos de estas hipoacusias (Kenneson et al., 2002; del Castillo and del Castillo, 2011). Sin embargo, hay que intentar incrementar este porcentaje de casos elucidados, añadiendo el cribado de otros genes al diagnóstico de rutina. Pocos estudios se han publicado que investiguen la contribución de cada uno de los más de 40 genes que se sabe que están implicados en estos trastornos al conjunto de los mismos (Duman *et al.*, 2011). Se ha observado que algunos genes tienen una contribución mayor (en torno al 3-10% de los casos), entre ellos *SLC26A4* (pendrina, hipoacusia DFNB4), *TMC1* (hipoacusia DFNB7/B11) y *OTOF* (otoferlina, hipoacusia DFNB9). No obstante, se observa una gran variabilidad en las contribuciones de cada gen entre las diferentes poblaciones. Es frecuente encontrar efectos fundadores para algunas mutaciones, que elevan enormemente la contribución del gen implicado en una población dada.

La optimización del diagnóstico de hipoacusias hereditarias se podrá conseguir mediante la aplicación de las técnicas de secuenciación masiva, pero debido a su todavía elevado coste, de momento no se utiliza como herramienta de rutina. Mientras tanto, sigue siendo necesario disponer de datos de epidemiología genética bien contrastados, que orienten el diagnóstico molecular. Para progresar en el conocimiento de estas materias en la población española, decidimos abordar en este trabajo el estudio de cinco de los genes implicados en hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas: *MYO15A*, *MYO3A*, *WHRN*, *MYO6* y *PTPRQ*, responsables de las hipoacusias de los tipos DFNB3, DFNB30, DFNB31, DFNB37 y DFNB84, respectivamente. Todos ellos tienen en común el codificar proteínas del citoesqueleto de los estereocilios de las células ciliadas.

## 1. Hipoacusia no sindrómica de tipo DFNB30

En el estudio del gen *MYO3A*, se investigaron 80 casos familiares no relacionados. Encontramos 15 variantes de secuencia polimórficas, pero ninguna con efectos patogénicos. Nuestros resultados son similares a los obtenidos en el cribado de 49 familias turcas (Duman et al., 2011). Hasta hoy, sólo tres mutaciones han sido descritas asociadas a DFNB30 (Tabla 22). Todas ellas fueron descritas en una misma familia de origen judío proveniente de la comunidad de Mosul (Iraq), que tiene un elevado grado de endogamia. La familia fue específicamente seleccionada para análisis de ligamiento por su elevado número de afectados, por lo que no proporciona datos con valor epidemiológico. Los afectados, distribuidos en tres generaciones, presentaban hipoacusia bilateral progresiva de manifestación tardía (segunda década de vida) (Walsh et al., 2002). Las variantes de secuencia encontradas incluían: una mutación que genera un codón de parada prematuro (c.3126T>G, p.Tyr1042\*); una mutación en el sitio aceptor de *splicing* del intrón 17, c.1777-12G>A, la cual se ha demostrado que provoca la delección del exón 18 y en consecuencia la generación de un codón de parada prematuro (codón 668); y una mutación en el sitio aceptor de *splicing* del intrón 7, c.732-2A>G, que lleva a la producción de un RNA mensajero inestable, que no es detectado en los pacientes con esta mutación en homocigosis.

Nuestros resultados juntamente con los de Duman et al (2011) demuestran que la hipoacusia de tipo DFNB30 es una forma muy rara de hipoacusia en las poblaciones hasta ahora estudiadas (Turquía y España). Entre las hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas, las formas progresivas y de manifestación tardía son infrecuentes. En consecuencia, el hallazgo de nuevas mutaciones en el gen *MYO3A* requerirá concentrar los cribados sobre familias expresamente seleccionadas por presentar este fenotipo.

**Tabla 22.** Mutaciones causantes de hipoacusia descritas en el gen *MYO3A*

Localización	cDNA	Proteína	Referencia
Intrón 7	c.732-2A->G		Walsh et al., 2002
Intrón 17	c.1777-12G>A		Walsh et al., 2002
Exón 28	c.3126T>G	p.Tyr1042*	Walsh et al., 2002

\*número de entrada NCBI del cDNA de *MYO3A*: NM\_017433.4

## 2. Hipoacusia no sindrómica de tipo DFNB31

En el estudio del gen *WHRN*, investigamos 81 casos familiares. Encontramos 10 variantes de secuencia, pero ninguna de ellas era patogénica. Nuestros resultados son similares a los obtenidos en cribados de otras cohortes de hipoacusia no sindrómica: 150 casos familiares europeos y chinos (Mburu et al., 2003) y 49 casos familiares turcos (Duman et al., 2011), en los que no se encontró ninguna mutación patogénica. En un cribado de 63 familias tunecinas, sí se descubrió una mutación patogénica, en homocigosis (Tlili et al., 2005). En el gen *WHRN* han sido descritas solamente dos mutaciones causantes de hipoacusia no sindrómica (Tabla 23), una en la familia tunecina ya mencionada y otra en la familia jordana, específicamente seleccionada para análisis de ligamiento por su elevado número de afectados, cuyo estudio condujo a la identificación del gen (Mburu et al., 2003). En estos dos casos familiares la hipoacusia era profunda.

Hasta la fecha cuatro mutaciones en el gen *WHRN* han sido también descritas como causantes de síndrome de Usher de tipo 2 (USH2), que asocia una característica hipoacusia moderada a retinosis pigmentaria de manifestación peripuberal o pospuberal (Tabla 23). La variabilidad fenotípica parece deberse a los efectos que tienen las mutaciones encontradas sobre las dos isoformas de la proteína y a la localización de éstas. La isoforma larga tiene una parte N-terminal que no está presente en la isoforma corta. La isoforma larga es la única que se expresa en retina, mientras que en oído interno se encuentran presentes las dos isoformas. Las mutaciones que causan síndrome de Usher, que se agrupan en los primeros exones del gen, provocarían degradación total del mensajero o isoformas largas truncadas muy tempranamente, a las que les faltarían al menos los dominios PDZ2 y PDZ3, por lo que no habría whirlina funcional en la retina. Por el contrario, las mutaciones causantes de hipoacusia no sindrómica provocarían la síntesis de isoformas truncadas, tanto largas como cortas (sus transcritos han sido detectados, por lo que se infiere que escapan a la degradación mediada por codones de parada prematuros). Las isoformas largas truncadas hacia el final de la proteína conservan los dominios PDZ1 y PDZ2, lo que evitaría el daño retiniano (Ebermann et al., 2007; Audo et al., 2011; Besnard et al., 2012).

Adicionalmente, en el estudio de una cohorte de 195 pacientes europeos que presentaban diferentes subtipos de síndrome de Usher, y que incluía 74 pacientes españoles, solamente se encontraron dos variantes de sustitución de aminoácido, pero

ambas en heterocigosis en los respectivos pacientes, sin que pudiera identificarse un segundo alelo mutante (Aller et al., 2011). De confirmarse estos casos, habría que revisar la interpretación de las correlaciones genotipo-fenotipo.

De todos estos estudios se concluye que las mutaciones en el gen *WHRN* son una causa rara de patología, tanto si nos referimos a hipoacusia no sindrómica como a síndrome de Usher, en todas las poblaciones estudiadas.

**Tabla 23.** Mutaciones causantes de hipoacusia descritas en el gen *WHRN*

Localización	cDNA	Proteína	Fenotipo	Referencia
Exón 1	c.307C>T	p.Gln103*	Síndrome de Usher tipo 2 (USH2D)	Ebermann et al., 2007
Exón 2	c.680dupG	Tyr228Leufs*37	Síndrome de Usher tipo 2 (USH2D)	Besnard et al., 2012
Exón 2	c.737delC	p.Pro246Hisfs*13	Síndrome de Usher tipo 2 (USH2D)	Audo et al., 2011 Besnard et al., 2012
Intrón 2	c.837+1G>A		Síndrome de Usher tipo 2 (USH2D)	Ebermann et al., 2007
Exón 10	c.2332C>T	p.Arg778*	Hipoacusia no sindrómica DFNB31	Mburu et al., 2003
Exón 11	c.2423delG	p.Gly808Aspfs*11	Hipoacusia no sindrómica DFNB31	Tlili et al., 2005

\*número de entrada NCBI del cDNA de *WHRN*: NM\_015404.3

### 3. Hipoacusia no sindrómica de tipo DFNB37

Nuestro estudio del gen *MYO6* en 79 familias con hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva reveló 9 variantes de secuencia, ninguna de ellas patogénica. Nuevamente, nuestros resultados son similares a los obtenidos en el cribado de la cohorte de 49 familias turcas (Duman et al., 2011). Mutaciones en *MYO6* causantes de hipoacusia autosómica recesiva sólo han sido descritas en tres familias de origen paquistaní, todas ellas en un mismo trabajo (Ahmed et al., 2003) (Tabla 24). Una de las familias fue específicamente seleccionada para análisis de ligamiento por su elevado número de afectados, pero las otras dos se encontraron al realizar el cribado de una cohorte compuesta por 250 familias de Pakistán y 100 de la India. En familias europeas, sólo han sido descritas mutaciones en familias con herencia autosómica dominante, que no era el objetivo de nuestro estudio (Tabla 24) (Melchionda et al., 2001; Mohiddin et al., 2004; Sanggaard et al., 2008; Hilgert et al., 2008).

Tomados en conjunto, estos datos indican que la hipoacusia de tipo DFNB37 es infrecuente en todas las poblaciones estudiadas (España, Turquía, India, Pakistán), con una contribución al conjunto de las hipoacusias recesivas inferior al 1%.

**Tabla 24.** Mutaciones causantes de hipoacusia descritas en el gen *MYO6*

Localización	cDNA	Proteína	Herencia	Referencia
Exón 2	c.36-37insT	p.Thr13Tyrfs*20	Recesiva	Ahmed et al., 2003
Exón 8	c.647A>T	p. Glu216Val	Recesiva	Ahmed et al., 2003
Exón 9	c. 737A>G	p.His246Arg	Dominante	Mohiddin et al., 2004
Exón 12	c.1325G>A	p.Cys442Tyr	Dominante	Melchionda et al., 2001
Intrón 23	c.IVS23+2321T>G		Dominante	Hilgert et al., 2008
Exón 25	c. 2545C>T	p.Arg849*	Dominante	Sanggaard et al., 2008
Exón 32	c.3496C>T	p.Arg1166*	Recesiva	Ahmed et al., 2003

\*número de entrada NCBI del cDNA de *MYO6*: NM\_004999.3

#### 4. Hipoacusia no sindrómica de tipo DFNB84

En el estudio del gen *PTPRQ* se investigaron 81 casos familiares no relacionados y se encontró una nueva variante patogénica, c.7129C>T (p.Arg2377\*), que se añade al espectro de mutaciones conocidas en el gen (Tabla 25). Hasta la fecha, sólo se han publicado dos trabajos en los que se describen mutaciones en el gen *PTPRQ* (Tabla 25). Schraders et al (2010) describen dos mutaciones en dos familias de un total de 80 familias estudiadas en su mayoría de ancestros holandeses, si bien una de las dos familias con mutación en *PTPRQ* era de origen marroquí. En el otro estudio no se proporcionan datos con valor epidemiológico (Shahin et al., 2010). Por su parte, Duman et al. (2011) no encuentran ninguna mutación patogénica en *PTPRQ* en su cohorte de 49 familias turcas. Tomados en conjunto, estos datos sugieren que las mutaciones en *PTPRQ* son relativamente infrecuentes en las poblaciones cribadas, con una contribución al conjunto de las hipoacusias recesivas en torno al 1%.

**Tabla 25.** Mutaciones patogénicas descritas en el gen *PTPRQ*

Localización	cDNA	Proteína	Origen	Referencia
Exón 19	c.1369A>G	p.Arg457Gly	Marruecos	Schraders et al., 2010
Exón 19	c.1491T>A	p.Tyr497*	Holanda	Schraders et al., 2010
Exón 22	c.1939C>T	p.Gln647*	Palestina	Shahin et al., 2010
Exón 55	c.7129C>T	p.Arg2377*	España	<a href="#">Este trabajo</a>

\* La nomenclatura utilizada se basa en el transcrito de la isoforma III de *PTPRQ*.

En este trabajo, la mutación p.Arg2377\* fue encontrada en una familia española de origen gitano. Es conocido que el pueblo gitano es originario del subcontinente indio, de donde partió, en sucesivas oleadas migratorias, hacia Europa. En consonancia con este origen, la población gitana europea comparte mutaciones causantes de enfermedad con las poblaciones india y pakistaní. En hipoacusias hereditarias, sabemos que la mutación p.W24X en el gen *GJB2* es frecuente en India y Pakistán y está documentada en las poblaciones gitanas de la República Checa, Eslovaquia y España (Alvarez *et al.*, 2005). Decidimos pues investigar la presencia de la mutación p.Arg2377\* en *PTPRQ* en 45 pacientes de etnia gitana no relacionados, de nuestra colección de laboratorio, pero no se encontró en ninguno de los casos. El resultado no es sorprendente, puesto que la estructura social del pueblo gitano es un conglomerado de poblaciones fundadoras aisladas genéticamente. De hecho, la frecuencia de la mutación p.W24X en series de controles de distintas regiones de España y de Eslovaquia es altamente variable (0,0% a 26,1%, según la serie). En hipoacusias hereditarias, otro ejemplo lo aporta la mutación c.1331+2T>C en el gen *MARVELD2*, que es frecuente en gitanos de la República Checa, pero no ha sido encontrada entre los gitanos españoles. La mutación p.Arg2377\* en *PTPRQ*, ausente en los casos españoles que hemos examinado, podría estar presente en casos de Europa Central o, alternativamente, podría ser una mutación privada como la mayoría de las que conocemos en los genes de hipoacusias.

En el caso de la mutación p.Arg2377\* descrita en este trabajo, las cuatro isoformas de *PTPRQ* descritas resultan afectadas. Lo mismo sucede en los otros tres casos descritos hasta la fecha (Shahin *et al.*, 2010; Schraders *et al.*, 2010), lo cual no aporta pistas sobre la función de las diferentes isoformas.

## **5. Hipoacusia no sindrómica de tipo DFNB3**

En nuestro estudio del gen *MYO15A* hemos encontrado mutaciones patogénicas en 5 de 89 casos familiares (5,6%) y en 4 de 80 casos esporádicos (5,0%) de nuestra cohorte española. Además, hemos encontrado una nueva mutación en *MYO15A* en una familia brasileña con numerosos afectados. Hasta el momento, sólo se habían descrito mutaciones en el gen *MYO15A* en casos familiares, por la dificultad de estudiar un gen con tantos exones en casos esporádicos en los que no es posible un análisis genético (ligamiento, haplotipos) previo. Nuestra aproximación experimental,

basada en la detección de mutaciones mediante el análisis de heterodúplex de ADN en DHPLC, ha resultado muy eficaz para la elucidación de este tipo de casos.

El hallazgo de que alrededor del 5% de los casos de hipoacusia no sindrómica que quedan por elucidar después del cribado de rutina (es decir, después de excluir las mutaciones en el locus *DFNB1*) se deben a mutaciones en el gen *MYO15A* es un dato muy valioso, porque indica que debemos enfocar el diagnóstico hacia este gen en nuestra población. Frecuencias similares se han observado en otras poblaciones: 3-5% en Pakistán (Liburd et al., 2001; Nal et al., 2007), 4% en Túnez (Belguith et al., 2009), 7-10% en Turquía (Cengiz et al., 2010; Duman et al., 2011). Hay que destacar que todos estos estudios se han realizado en familias consanguíneas de ancestros no europeos. Nuestro estudio es el primero realizado sobre familias no consanguíneas de una población europea.

Por lo que respecta a la población brasileña, no existen estudios epidemiológicos sobre la frecuencia de mutaciones en el gen *MYO15A*, pero sí llama la atención que dos familias con numerosos afectados de hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva, en las que se había excluido la implicación del locus *DFNB1*, lleven mutaciones en el gen *MYO15A* (Lezirovitz et al., 2008; y este trabajo). En el estudio de Lezirovitz et al. se describen dos nuevas mutaciones presentes en una enorme familia de la costa nordeste brasileña. Nuestro estudio describe por primera vez una variante *DFNB3/MYO15A* en una población de la Amazonia brasileña, región geográfica y étnicamente distinta. Además, podemos predecir una elevada tasa de portadores para la mutación p.Arg1536\* en la isla de Maiandeuá, debido al efecto fundador combinado con el elevado número de uniones consanguíneas en la región.

El tamaño del gen *MYO15A*, con su elevado número de exones hace que la búsqueda de mutaciones en pacientes con hipoacusia recesiva, para el diagnóstico molecular de rutina, sea cara y casi inviable. Sin embargo, la relativamente alta frecuencia de mutaciones identificadas en las distintas poblaciones apoya el desarrollo y creación de nuevas estrategias de cribado. El análisis de heterodúplex de ADN en DHPLC puede ser una solución provisional. Ya hemos mencionado que una solución más prometedora debe venir de la aplicación de las técnicas de secuenciación masiva. La secuenciación de paneles de genes en los que están representados todos los genes de hipoacusia no sindrómica conocidos, y que se realiza en ultrasecuenciadores de gama alta, es muy eficaz, pero todavía inviable, por su coste, como herramienta de rutina. Sería posible, sin embargo, enfocar la secuenciación masiva específicamente



hacia el gen *MYO15A*, en equipos de ultrasecuenciación de gama media, lo que permitiría cribar un número elevado de pacientes a un coste razonable.

En total, hemos identificado 14 alelos mutantes diferentes, ninguno de ellos descrito previamente. Nuestros resultados expanden notoriamente el conocimiento sobre el espectro mutacional del gen *MYO15A*, que ahora incluye 59 mutaciones patogénicas (incremento del 31%) (Tabla 26). No existe un “punto caliente” que acumule una mayoría de mutaciones, sino que éstas se distribuyen a lo largo de todo el gen. La aparente concentración de cambios en el exón 2 se justifica por la considerable longitud del mismo y no por la existencia de un punto caliente. Esta distribución de mutaciones complica el diagnóstico molecular de rutina, puesto que la detección de mutaciones no puede restringirse a ninguna parte del gen en concreto.

La mayoría (12 de 14) de las mutaciones encontradas en nuestro estudio son mutaciones “privadas” y se han descrito en una única familia. Las excepciones son c.4891G>A (encontrada en dos casos esporádicos, ambos de la Comunidad Valenciana, lo que sugiere un posible efecto fundador en la región) y c.6004delG (un caso familiar de Madrid y uno esporádico de Barcelona). El análisis de haplotipos para los marcadores microsatélites cercanos al gen no excluye totalmente que estos casos, no emparentados entre sí, puedan compartir ancestros comunes. Será necesario genotipar marcadores intragénicos de tipo SNP para aclarar esta cuestión. Por otra parte, la extensión del cribado a un mayor número de pacientes podrá confirmar si estas dos mutaciones aparecen en un número de casos suficientemente elevado como para merecer la aplicación de tests de detección específicos en el diagnóstico de rutina.

Algo más de la mitad (33 de 59) de las mutaciones conocidas generan directamente codones de parada prematuros (*nonsense*), o lo hacen indirectamente (deleciones, duplicaciones, y mutaciones de los sitios de *splicing*, que provocan cambios de la fase de lectura). Se encuentran distribuidas a lo largo de todo el gen (Tabla 26 y Figura 32). Se hipotetiza que podrían producir proteínas truncadas o, lo que es más probable, que los correspondientes transcritos serían degradados por los mecanismos de supervisión celulares (*nonsense-mediated mRNA decay*). Todas ellas deben considerarse mutaciones que anulan la función de la proteína, con un evidente potencial patogénico.

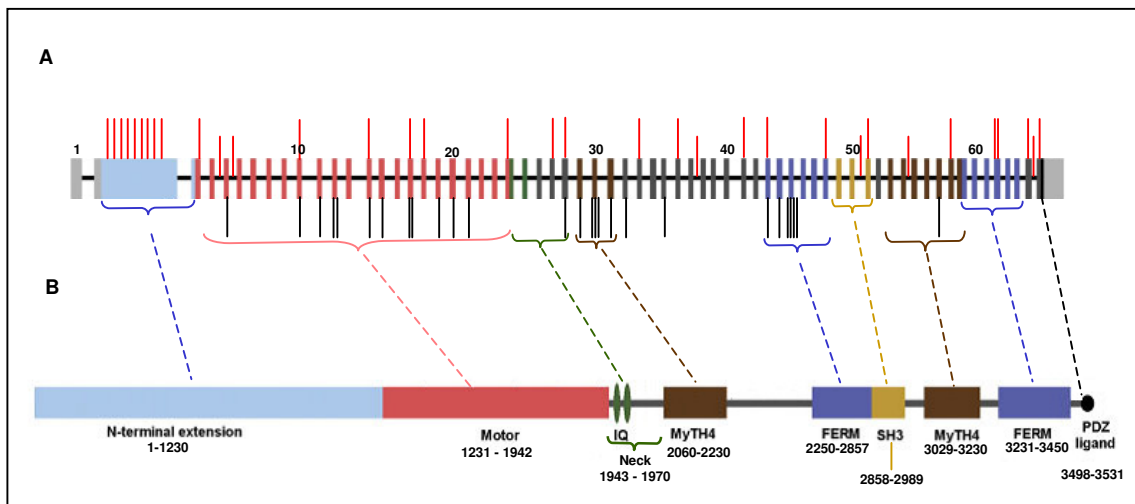
El otro grupo numeroso (25 de 59) lo constituyen las mutaciones que provocarían sustitución de aminoácido. A diferencia de las mutaciones del grupo anterior, éstas sí están concentradas en regiones concretas del gen, las que codifican los dominios motor (11 mutaciones), del “cuello” (1 mutación), MyTH4-a (6 mutaciones), FERM-a (6 mutaciones), y MyTH4-b (1 mutación) (Figura 32). Esta concentración de mutaciones confirma la importancia funcional de estos dominios. El dominio motor es esencial para la función de la miosina por contener los sitios de unión a ATP (residuos 1315-1322) y a actina (residuos 1792-1799); hay que destacar que todavía no se conoce ninguna mutación de sustitución de aminoácido que afecte directamente a estos residuos. En ratones, mutaciones en el dominio motor están asociadas con el tamaño anormal del paquete de estereocilios y la pérdida de la arquitectura madura en forma de escalera (Probst et al., 1998; Anderson et al., 2000; Belyantseva et al., 2003a). Por su parte, los dominios MyTH4 suelen estar implicados en la unión a microtúbulos, así como en la unión de actina a la membrana (Weber et al., 2004). Estudios *in vitro* demuestran que el dominio MyTH4-b y los dominios FERM participan en la unión a los dominios PDZ de la whirlina (Delprat et al., 2005).

La patogenicidad de las mutaciones de sustitución de aminoácido en *MYO15A*, siempre complicada de determinar, viene apoyada por la elevada conservación de los residuos a lo largo de la evolución, su localización en dominios necesarios para la función de la proteína, su ausencia en individuos controles normoyentes, y sus puntuaciones en los programas de predicción (SIFT, Polyphen). Mención aparte merece la mutación c.8050T>C (p.Tyr2684His), que afecta a un residuo muy conservado (puntuación Conseq = 9), puntuaciones SIFT y Polyphen claramente sugerentes de patogenicidad, y encontrada en *trans* con un alelo aparentemente patogénico (p.Arg1763Trp) en los dos pacientes de un caso familiar; sin embargo, la mutación ha aparecido en 1 de los 100 cromosomas control investigados. Este caso ilustra la dificultad de trasladar los datos de investigación a la aplicación práctica del consejo genético. Será necesario cribar un mayor número de casos de afectados y de controles, así como la realización de ensayos funcionales sobre la proteína mutante para elucidar este punto.

Es igualmente destacable el hallazgo en este estudio de un alelo mutante compuesto, que lleva los cambios c.4989\_4994del (que provoca la eliminación de dos aminoácidos del dominio motor, conservando la fase de lectura) y c.6520G>A (que provoca la sustitución de aminoácido p.Asp2174Asn en el dominio MyTH4-a). De acuerdo con los criterios que hemos expuesto, ambos cambios tienen la potencialidad

de ser patogénicos. Por consiguiente, podría ocurrir que la pérdida de función de la proteína se deba a uno, al otro, o precisamente a la combinación de los dos. A medida que se progrese más en el conocimiento del espectro de mutaciones del gen, es probable que alguno de los dos cambios se encuentre por separado, lo que daría pistas para entender lo que sucede en este alelo compuesto.

En general, la hipoacusia de tipo DFNB3 se considera prelocutiva y severa o profunda. Esta correlación se observa en la mayoría de nuestros casos (Tabla 20). La hipoacusia solamente es moderada en dos casos: los individuos afectados de la familia S427 y el caso esporádico E693. En la familia S427, el genotipo que se observa es p.Ala2739Pro homocigoto, lo que se podría interpretar como que esta sustitución de aminoácido tiene un efecto menor sobre la función de la proteína, de ahí el fenotipo moderado. Sin embargo, el fenotipo moderado del caso E693 se observa en relación con un genotipo que incluye mutaciones de cambio de fase de lectura y codones de parada prematuros. La dificultad para establecer correlaciones genotipo-fenotipo relativamente seguras es característica de las hipoacusias hereditarias, y probablemente corresponde a la influencia de genes modificadores todavía pendientes de identificar.



**Figura 32:** Distribución de mutaciones en el gen *MYO15A*. **A.** Distribución de mutaciones sobre la estructura exón/intrón del gen. Los exones están representados por barras verticales, del mismo color que el dominio proteico que codifican. Cada línea vertical indica la posición de una mutación. En la parte superior, se muestran en rojo las mutaciones que generan codones de parada prematuros. En la parte inferior se muestran en negro las mutaciones de sustitución de aminoácido. **B.** Dominios en la miosina XVA. Debajo de cada dominio, se indican los aminoácidos que lo componen.

**Tabla 26.** Mutaciones MYO15A descritas como causantes de sordera *DFNB3*

Localización	cDNA	Proteína	Referencia
Exón 2	c.373_374del	p. Arg125Valfs*102	Brownstein et al., 2011
Exón 2	c.867C>G	p.Tyr289*	Duman et al., 2011; Cengiz et al., 2010,
Exón 2	c.915C>A	p.Tyr305*	<a href="#">Este trabajo</a>
Exón 2	c.1047C>A	p.Tyr349*	Imtiaz et al., 2011
Exón 2	c.1137delC	p.Tyr380Metfs*64	<a href="#">Este trabajo</a>
Exón 2	c.1185dupC	p.Glu396Argfs*36	Bashir et al., 2012
Exón 2	c.2384dupC	p.Ser796Valfs*184	<a href="#">Este trabajo</a>
Exón 2	c.3313G>R	p. Glu1105*	Nal et al., 2007
Exón 2	c.3334delG	p.Arg1113Valfs*12	Nal et al., 2007
Exón 3	c.3685C>T	p. Gln1229*	Liburd et al., 2001
Intrón 4	c.3756+1G>T		Liburd et al., 2001
Exón 5	c.3758C>T	p.Thr1253Ile	Nal et al., 2007
Intrón 5	c.3866+1G>A		Nal et al., 2007
Exón 10	c.4176C>A	p.Tyr1392*	Nal et al., 2007
Exón 10	c.4198G>A	p.Val1400Met	Tekin et al., 2010; Cengiz et al., 2010,
Exón 11	c.4240G>A	p.Glu1414Lys	Brownstein et al., 2011
Exón 12	c.4351G>A	p.Asp1451Asn	Nal et al., 2007
Exón 12	c.4441T>C	p.Ser1481Pro	Tekin et al., 2010; Cengiz et al., 2010,
Exón 14	c.4606 C>T	p.Arg1536*	<a href="#">Este trabajo</a>
Exón 14	c.4642G>A	p.Ala1548Thr	<a href="#">Este trabajo</a>
Exón 15	c.4669 A>G	p.Lys1557Glu	Nal et al., 2007
Exón 17	c.4891G>A	p.Glu1631Lys	<a href="#">Este trabajo</a>
Exón 17	c.4989_4994del	p.Gln1664_Cys1665del	<a href="#">Este trabajo</a>
Exón 17	c.4998C>A	p.Cys1666*	Belguith et al., 2009
Exón 18	c.5117_5118del	p. Gly1706Glufs*102	Nal et al., 2007
Exón 19	c.5189T>C	p.Leu1730Pro	Nal et al., 2007
Exón 20	c.5287C>T	p.Arg1763Trp	<a href="#">Este trabajo</a>
Exón 21	c.5492G>T	p. Gly1831Val	Kalay et al., 2007
Exón 24	c.5807_5813delCCCGTGG	p.Arg1937Thrfs*10	Tekin et al., 2010; Cengiz et al., 2010,
Exón 27	c.6004delG	p.Glu2002Argfs*27	<a href="#">Este trabajo</a>
Exón 28	c.6052G>A	p.Gly2018Arg	Nal et al., 2007
Exón 28	c.6061C>T	p.Gln2021*	Nal et al., 2007
Exón 29	c.6217C>T	p.Pro2073Ser	Shearer et al., 2009
Exón 30	c.6331A>T	p.Asn2111Tyr	Wang et al., 1998
Exón 30	c.6337A>T	p.Ile2113Phe	Wang et al., 1998
Exón 30	c.6371G>A	p.Arg2124Gln	Shearer et al., 2009 Najmabadi et al., 2009
Exón 31	c.6520G>A	p.Asp2174Asn	<a href="#">Este trabajo</a>
Exón 32	c.6731G>A	p.Gly2244Glu	Nal et al., 2007
Exón 33	c.7982C>A	p.Ser2661*	Duman et al., 2011
Exón 35	c.6796g>a	p.Val2266Met	Nal et al., 2007
Exón 36	c.7545G>T	p.Asp2403fs*2414	Shahin et al., 2010
Intrón 37	c.7395+3G>C		Belguith et al., 2009
Exón 41	c.7801A>T	p.Lys2601*	Wang et al., 1998
Exón 43	c.8050T>C	p.Tyr2684His	<a href="#">Este trabajo</a>
Exón 43	c.8065delT	p.Trp2689Glyfs*49	<a href="#">Este trabajo</a>
Exón 44	c.8148G>T	p.Gln2716His	Liburd et al., 2001
Exón 45	c.8158G>C	p. Asp2720His	Nal et al., 2007
Exón 45	c.8183G>A	p. Arg2728His	Brownstein et al., 2011
Exón 45	c.8215G>C	p.Ala2739Pro	<a href="#">Este trabajo</a>
Exón 48	c.8548C>T	p.Arg2850*	<a href="#">Este trabajo</a>
Intrón 50	c.8968-1G>C		Kalay et al., 2007
Exón 51	c.8821_8822insTG	p.Gly2941Valfs*94	Nal et al., 2007
Intrón 54	c.9229+1G>A		Belguith et al., 2009
Exón 57	c.9478C>T	p.Leu3160Phe	Nal et al., 2007
Exón 62	c.9958_9961del	p. Asp3320Thrfs*2	Lezirovitz et al., 2008
Exón 62	c.9995_10002dup	p. Ser3335Alafs*121	Cengiz et al., 2010, Duman et al., 2011

Localización	cDNA	Proteína	Referencia
<b>Exón 65</b>	c.10474C>T	p.Gln3492*	Nal et al., 2007
<b>Intrón 65</b>	IVS65+1 G>T		<a href="#">Este trabajo</a>
<b>Exón 66</b>	c.10573delA	p.Ser3525Alafs*29	Lezirovitz et al., 2008

## *CONCLUSIONES*

## CONCLUSIONES

1. Las hipoacusias de tipos DFNB30, DFNB31, DFNB37 y DFNB84 causadas por mutaciones en los genes *MYO3A*, *WHRN*, *MYO6* y *PTPRQ* respectivamente, no contribuyen de manera significativa (<1%) al conjunto de hipoacusias no sindrómicas de herencia autosómica recesiva en la población española.
2. La hipoacusia de tipo DFNB3, causada por mutaciones en el gen *MYO15A*, da cuenta de aproximadamente el 5% de los casos de hipoacusias autosómicas recesivas una vez excluidos los casos de tipo DFNB1. Se trata de una contribución muy significativa que demanda incluir al gen *MYO15A* en los cribados diagnósticos asistenciales.
3. Globalmente, las mutaciones patogénicas en el gen *MYO15A* se distribuyen a lo largo de todo el gen, sin que existan puntos de mayor concentración de mutaciones. El subgrupo de mutaciones de sustitución de aminoácido sí se concentran en los dominios funcionales.
4. La mayoría de las mutaciones patogénicas en el gen *MYO15A* son privadas, no se repiten en más de un caso.
5. La hipoacusia de tipo DFNB3 es en general prelocutiva y severa o profunda, pero hay una minoría de casos con hipoacusia moderada, lo que dificulta el establecimiento de una clara correlación genotipo-fenotipo.

## *BIBLIOGRAFIA*



Adato A, Lefèvre G, Delprat B, Michel V, Michalski N, Chardenoux S, Weil D, El-Amraoui A, Petit C (2005). Usherin, the defective protein in Usher syndrome type IIA, is likely to be a component of interstereocilia ankle links in the inner ear sensory cells. *Hum Mol Genet*. Dec 15;14(24):3921-32. Epub 2005 Nov 21.

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. Apr;7(4):248-9.

Ahituv N, Sobe T, Robertson NG, Morton CC, Taggart RT, Avraham KB (2000). Genomic structure of the human unconventional myosin VI gene. *Gene*. Dec 31;261(2):269-75.

Ahmed ZM, Morell RJ, Riazuddin S, Gropman A, Shaukat S, Ahmad MM, Mohiddin SA, Fananapazir L, Caruso RC, Husnain T, Khan SN, Griffith AJ, Friedman TB, Wilcox ER (2003). Mutations of MYO6 are associated with recessive deafness, DFNB37. *Am J Hum Genet*. 72, 1315–22.

Aller E, Jaijo T, van Wijk E, Ebermann I, Kersten F, García-García G, Voeselek K, Aparisi MJ, Hoefsloot L, Cremers C, Díaz-Llopis M, Pennings R, Bolz HJ, Kremer H, Millán JM (2010). Sequence variants of the DFNB31 gene among Usher syndrome patients of diverse origin. *Mol Vis*. Mar 23;16:495-500.

Alvarez A, del Castillo I, Villamar M, Aguirre LA, González-Neira A, López-Nevot A, Moreno-Pelayo MA, Moreno F (2005). High prevalence of the W24X mutation in the gene encoding connexin-26 (GJB2) in Spanish Romani (gypsies) with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *Am J Med Genet A*. Sep 1;137A(3):255-8

Anderson DW, Probst FJ, Belyantseva IA, Fridell RA, Beyer L, Martin DM, Wu D, Kachar B, Friedman T B, Raphael Y, Camper SA (2000). The motor and tail regions of myosin XV are critical for normal structure and function of auditory and vestibular hair cells. *Hum Mol Genet* 9, 1729–38.

Audo I, Bujakowska K, Mohand-Saïd S, Tronche S, Lancelot ME, Antonio A, Germain A, Lonjou C, Carpentier W, Sahel JA, Bhattacharya S, Zeitz C (2011). A novel DFNB31 mutation associated with Usher type 2 syndrome showing variable degrees of auditory loss in a consanguineous Portuguese family. *Mol Vis*. 17:1598-606.

Avraham KB, Hasson T, Steel KP, Kingsley DM, Russell LB, Mooseker MS, Copeland NG, Jenkins NA (1995). The mouse Snell's waltzer deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. *Nat Genet*. 11: 369-75.

Bahler, M (2000). Are class III and class IX myosins motorized signaling molecules? *Biochim. Biophys. Acta* 1496, 52–59.

Baker JP, Titus MA (1998). Myosins: matching functions with motors. *Curr Opin Cell Biol* 10:80–86.

Belguith H, Aifa-Hmani M, Dhouib H, Said MB, Mosrati MA, Lahmar I, Moalla J, Charfeddine I, Driss N, Arab SB, Ghorbel A, Ayadi H, Masmoudi S (2009). Screening of the DFNB3 locus: identification of three novel mutations of MYO15A associated with hearing loss and further suggestion for two distinctive genes on this locus. *Genet Test Mol Biomarkers*. Feb;13(1):147-51.

Belyantseva IA, Boger ET, Friedman TB (2003). Myosin XVa localizes to the tips of inner ear sensory cell stereocilia and is essential for staircase formation of the hair bundle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13958–63.

- Belyantseva IA, Boger ET, Naz S, Frolenkov GI, Sellers JR, Ahmed ZM, Griffith AJ, Friedman TB (2005). Myosin-XVa is required for tip localization of whirlin and differential elongation of hair-cell stereocilia. *Nat Cell Biol.* Feb;7(2):148-56. Epub 2005 Jan 16.
- Berezin C, Glaser F, Rosenberg J, Paz I, Pupko T, Fariselli P, Casadio R, Ben-Tal N. ConSeq: the identification of functionally and structurally important residues in protein sequences (2004). *Bioinformatics.* May 22;20(8):1322-4. Epub 2004 Feb 10.
- Berg JS, Powell BC, Cheney RE (2001). A millennial myosin census. *Mol. Biol. Cell* 12, 780–794.
- Besnard T, Vaché C, Baux D, Larrieu L, Abadie C, Blanchet C, Odent S, Blanchet P, Calvas P, Hamel C, Dollfus H, Lina-Granade G, Lespinasse J, David A, Isidor B, Morin G, Malcolm S, Tuffery-Giraud S, Claustres M, Roux AF (2012). Non-USH2A mutations in USH2 patients. *Hum Mutat.* Mar;33(3):504-10. doi: 10.1002/humu.22004. Epub 2012 Jan 6.
- Boger E, Boger ET, Frolenkov GI, Friedman TB, Belyantseva IA (2008). Myosins: A Superfamily of Molecular Motors. Springer Publishers ISBN: 978-1-4020-6516-3, Chapter 16: Myosin XVa, 441-467.
- Cengiz FB, Duman D, Sirmaci A, Tokgöz-Yilmaz S, Erbek S, Oztürkmen-Akay H, Incesulu A, Edwards YJ, Ozdag H, Liu XZ, Tekin M (2010). Recurrent and private MYO15A mutations are associated with deafness in the Turkish population. *Genet Test Mol Biomarkers.* Aug;14(4):543-50.
- Cryns K, Van Camp G (2004). Deafness genes and their diagnostic applications. *Audiol Neurotol.* Jan-Feb;9(1):2-22. Review.
- Dalal JS, Stevens SM Jr, Alvarez S, Munoz N, Kempler KE, Dosé AC, Burnside B, Battelle BA (2011). Mouse class III myosins: kinase activity and phosphorylation sites. *J Neurochem.* Nov;119(4):772-84. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07468.x. Epub 2011 Oct 4.
- Dallos P, Fay, Richard R (1996). (Eds.). *The Cochlea*. Series: Springer Handbook of Auditory Research, Vol. 8., 551 p. 134 illus.
- del Castillo FJ, Del Castillo I (2012). Genetics of isolated auditory neuropathies. *Front Biosci.* Jan 1;17:1251-65. Review.
- Delprat B, Michel V, Goodyear R, Yamasaki Y, Michalski N, El-Amraoui A, Perfettini I, Legrain P, Richardson G, Hardelin JP, Petit C (2005). Myosin XVa and whirlin, two deafness gene products required for hair bundle growth, are located at the stereocilia tips and interact directly. *Hum Mol Genet* 14, 401–10.
- Deol M & Green M (1966). Snell's Waltzer, a new mutation affecting behaviour and the inner ear of the mouse. *Genet Res* 8, 339–45.
- Donaudy F, Ferrara A, Esposito L, Hertzano R, Ben-David O, Bell RE, Melchionda S, Zelante L, Avraham KB, Gasparini P (2003). Multiple mutations of MYO1A, a cochlear-expressed gene, in sensorineural hearing loss. *Am J Hum Genet.* 72:1571-7
- Dosé A, Lin-Jones J, Burnside B (2004). Myosin III in Photoreceptors: What Does It Do? In: Williams DS, editor. *Photoreceptor cell biology and inherited retinal degenerations*. River Edge, N.J.: World Scientific Pub. pp. 133–162.
- Dosé AC, Burnside B (2000). Cloning and chromosomal localization of a human class III myosin. *Genomics* 67:333–342

Dosé AC, Hillman DW, Wong C, Sohlberg L, Lin-Jones J, Burnside B (2003). Myo3A, one of two class III myosin genes expressed in vertebrate retina, is localized to the calycal processes of rod and cone photoreceptors and is expressed in the sacculus. *Mol Biol Cell*. Mar;14(3):1058-73.

Duman D, Sirmaci A, Cengiz FB, Ozdag H, Tekin M (2011). Screening of 38 genes identifies mutations in 62% of families with nonsyndromic deafness in Turkey. *Genet Test Mol Biomarkers*. Jan-Feb;15(1-2):29-33. Epub 2010 Nov 30. Erratum in: *Genet Test Mol Biomarkers*. 2011 Sep;15(9):663.

Ebermann I, Scholl HP, Charbel Issa P, Becirovic E, Lamprecht J, Jurklics B, Millán JM, Aller E, Mitter D, Bolz H (2007). A novel gene for Usher syndrome type 2: mutations in the long isoform of whirlin are associated with retinitis pigmentosa and sensorineural hearing loss. *Hum Genet*. Apr;121(2):203-11.

Fleming J, Rogers MJ, Brown SD, Steel KP (1994). Linkage analysis of the whirler deafness gene on mouse chromosome 4. *Genomics*. May 1;21(1):42-8.

Foth BJ, Goedecke MC, Soldati D (2006). New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3681–6.L

Friedman TB, Liang Y, Weber JL, Hinnant JT, Barber TD, Winata S, Arhya IN, Asher JH, Jr (1995). A gene for congenital, recessive deafness DFNB3 maps to the pericentromeric region of chromosome 17. *Nat Genet* 9, 86–91

Fukuda Y (2002). *Guia de Otorrinolaringologia*. Manole. ISBN: 85-204-1446-x.

Gibson F, Walsh J, Mburu P, Varela A, Brown KA, Antonio M, Beisel KW, Steel KP, Brown SD (1995). A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-1. *Nature*. 374: 62-4.

Goodyear R, Richardson G (1992). Distribution of the 275 kD hair cell antigen and cell surface specialisations on auditory and vestibular hair bundles in the chicken inner ear. *J Comp Neurol*. Nov 8;325(2):243-56.

Goodyear RJ, Legan PK, Wright MB, Marcotti W, Oganessian A, Coats SA, Booth CJ, Kros CJ, Seifert RA, Bowen-Pope DF, Richardson GP (2003). A receptor-like inositol lipid phosphatase is required for the maturation of developing cochlear hair bundles. *J Neurosci* 23:9208-9219.

Goodyear RJ, Richardson GP (2003). A novel antigen sensitive to calcium chelation that is associated with the tip links and kinocilial links of sensory hair bundles. *J Neurosci*. Jun 15;23(12):4878-87.

Guilford P, Ben Arab S, Blanchard S, Levilliers J, Weissenbach J, Belkahia A and Petit C (1994). A non-syndrome form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nat. Genet* 1: 24-28.

Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.

Harris BZ and Lim WA (2001). Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci* 114, 3219–31.

Hasson T, Gillespie PG, Garcia JA, MacDonald RB, Zhao Y, Yee AG, Mooseker MS, Corey DP (1997). Unconventional myosins in inner-ear sensory epithelia. *J Cell Biol*. 137:1287-307

Hasson T (2003). Myosin VI: two distinct roles in endocytosis. *J. Cell. Sci.*;116:3453-3461.

- Hilgert N, Smith RJ, Van Camp G (2009). Function and expression pattern of nonsyndromic deafness genes. *Curr Mol Med*. Jun;9(5):546-64.
- Hilgert N, Topsakal V, van Dinther J, Offeciers E, Van de Heyning P, Van Camp G (2008). A splice-site mutation and overexpression of MYO6 cause a similar phenotype in two families with autosomal dominant hearing loss. *Eur J Hum Genet*. May;16(5):593-602. Epub 2008 Jan 23.
- Hirono M, Denis CS, Richardson GP, and Gillespie PG (2004). Hair cells require phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate for mechanical transduction and adaptation. *Neuron* 44, 309–320.
- Hodge T. and Cope MJ (2000). A myosin family tree. *J Cell Sci* 113 Pt 19, 3353–4.
- Holme RH, Kiernan BW, Brown SD, Steel KP (2002). Elongation of hair cell stereocilia is defective in the mouse mutant whirler. *J Comp Neurol*. Aug 12;450(1):94-102.
- Huang JD, Brady ST, Richards BW, Stenolen D, Resau JH, Copeland NG, Jenkins NA (1999). Direct interaction of microtubule and actin-based transport motors. *Nature* 397:267–270.
- Hung AY, and Sheng M (2002). PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J Biol Chem* 277, 5699–702.
- Kalatzis V and Petit C (1998). The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum. Mol. Genet* 7(10):1589-1597.
- Kay BK, Williamson MP, and Sudol M (2000). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *Faseb J* 14, 231–41.
- Kenneson A, Van Naarden Braun K, Boyle C (2002). GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review. *Genet Med*. Jul-Aug;4(4):258-74. Review.
- Kersten FF, van Wijk E, van Reeuwijk J, van der Zwaag B, Märker T, Peters TA, Katsanis N, Wolfrum U, Keunen JE, Roepman R, Kremer H (2010). Association of whirlin with Cav1.3 (alpha1D) channels in photoreceptors, defining a novel member of the usher protein network. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. May;51(5):2338-46. Epub 2009 Dec 3
- Kochhar A, Hildebrand MS, Smith RJ (2007). Clinical aspects of hereditary hearing loss. *Genet Med*. Jul;9(7):393-408.
- Lalwani AK, Goldstein JA, Kelley MJ, Luxford W, Castelein CM, Mhatre AN (2000). Human nonsyndromic hereditary deafness DFNA17 is due to a mutation in nonmuscle myosin MYH9. *Am J Hum Genet*. 67: 1121-8.
- Lezirovitz K, Pardono E, de Mello Auricchio MT, de Carvalho E Silva FL, Lopes JJ, Abreu-Silva RS, Romanos J, Batissoco AC, Mingroni-Netto RC (2008). Unexpected genetic heterogeneity in a large consanguineous Brazilian pedigree presenting deafness. *Eur J Hum Genet*. Jan;16(1):89-96. Epub 2007 Sep 12.
- Liang Y, Wang A, Belyantseva IA, Anderson DW, Probst FJ, Barber TD, Miller W, Touchman JW, Jin L, Sullivan SL, Sellers JR, Camper SA, Lloyd RV, Kachar B, Friedman TB, and Fridell RA (1999). Characterization of the human and mouse unconventional myosin XV genes responsible for hereditary deafness DFNB3 and shaker 2. *Genomics* 61, 243–58.
- Liang Y, Wang A, Probst FJ, Arhya IN, Barber TD, Chen KS, Deshmukh D, Dolan DF, Hinnant JT, Carter LE, Jain PK, Lalwani AK, Li XC, Lupski JR, Moeljopawiro S, Morell R, Negrini C, Wilcox

ER, Winata S, Camper SA, Friedman TB (1998). Genetic mapping refines DFNB3 to 17p11.2, suggests multiple alleles of DFNB3, and supports homology to the mouse model shaker-2. *Am J Hum Genet.* 62 :904-15.

Liburd N, Ghosh M, Riazuddin S, Naz S, Khan S, Ahmed Z, Riazuddin S, Liang Y, Menon PS, Smith T, Smith AC, Chen KS, Lupski JR, Wilcox ER, Potocki L, and Friedman TB (2001). Novel mutations of MYO15A associated with profound deafness in consanguineous families and moderately severe hearing loss in a patient with Smith-Magenis syndrome. *Hum Genet* 109, 535–41.

Maerker T, van Wijk E, Overlack N, Kersten FF, McGee J, Goldmann T, Sehn E, Roepman R, Walsh EJ, Kremer H, Wolfrum U (2008). A novel Usher protein network at the periciliary reloading point between molecular transport machineries in vertebrate photoreceptor cells. *Hum Mol Genet.* Jan 1;17(1):71-86. Epub 2007 Sep 28.

Mburu P, Kikkawa Y, Townsend S, Romero R, Yonekawa H, Brown SD (2006). Whirlin complexes with p55 at the stereocilia tip during hair cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 18;103(29):10973-8. Epub 2006 Jul 7.

Mburu P, Mustapha M, Varela A, Weil D, El-Amraoui A, Holme RH, Rump A, Hardisty RE, Blanchard S, Coimbra RS, Perfettini I, Parkinson N, Mallon AM, Glenister P, Rogers MJ, Paige AJ, Moir L, Clay J, Rosenthal A, Liu XZ, Blanco G, Steel KP, Petit C, Brown SD (2003). Defects in whirlin, a PDZ domain molecule involved in stereocilia elongation, cause deafness in the whirler mouse and families with DFNB31. *Nat Genet.* Aug;34(4):421-8.

Melchionda S, Ahituv N, Bisceglia L, Sobe T, Glaser F, Rabionet R, Arbones ML, Notarangelo A, Di Iorio E, Carella M, Zelante L, Estivill X, Avraham KB, Gasparini P (2001). MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice, is mutated in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *Am J Hum Genet.* Sep;69(3):635-40. Epub 2001 Jul 20.

Mermall V, Post PL, Mooseker MS (1998). Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science* 279:527–533.

Mohiddin SA, Ahmed ZM, Griffith AJ, Tripodi D, Friedman TB, Fananapazir L, Morell RJ (2004). Novel association of hypertrophic cardiomyopathy, sensorineural deafness, and a mutation in unconventional myosin VI (MYO6). *J Med Genet.* Apr;41(4):309-14.  
Montell C, Rubin GM (1988). The *Drosophila* ninaC locus encodes two photoreceptor cell specific proteins with domains homologous to protein kinases and the myosin heavy chain head. *Cell* 52:757–772.

Mooseker MS, Cheney RE (1995). Unconventional myosins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11:633-75 .

Morton CC (2002). Genetics, genomics and gene discovery in the auditory system. *Hum Mol Genet* 15; 11(10): 1229-1240.

Morton CC, Nance WE (2006). Newborn hearing screening--a silent revolution. *N Engl J Med.* May 18;354(20):2151-64.

Mustapha M, Chouery E, Chardenoux S, Naboulsi M, Paronnaud J, Lemainque A, Mégarbané A, Loiselet J, Weil D, Lathrop M, Petit C (2002). DFNB31, a recessive form of sensorineural hearing loss, maps to chromosome 9q32-34. *Eur J Hum Genet.* Mar;10(3):210-2.

Nal N, Ahmed ZM, Erkal E, Alper O, Lüleci G, Dinç O, Chattaraj P, SR, Boger ET, Kabra M, Ghosh M, Riazuddin S, Morell RJ, and Friedman TB (2007). Mutational spectrum of MYO15A: the large N-terminal extension of myosin XVa is required for hearing. *Hum Mut* 28(10), 1014–1019.

Nayak GD, Ratnayaka HS, Goodyear RJ, Richardson GP (2007). Development of the hair bundle and mechanotransduction. *Int J Dev Biol.*;51(6-7):597-608.

Oganesian A, Poot M, Daum G, Coats SA, Wright MB, Seifert RA, Bowen-Pope DF (2003). Protein tyrosine phosphatase RQ is a phosphatidylinositol phosphatase that can regulate cell survival and proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7563–7568.

Oliver, TN, Berg, JS and Cheney, RE (1999). Tails of unconventional myosins. *Cell Mol Life Sci* 56(3–4), 243–57.

Ott J (1991). *Analysis of Human Genetic Linkage*, revised edition. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 223 pages.

Petit C, Levilliers J and Hardelin JP (2001). Molecular Genetics of Hearing Loss. *Annu Rev Genet* 35: 589-646.

Probst FJ, Chen KS, Zhao Q, Wang A, Friedman TB, Lupski JR, Camper SA (1999). A physical map of the mouse shaker-2 region contains many of the genes commonly deleted in Smith-Magenis syndrome (del17p11.2p11.2). *Genomics*. Feb 1;55(3):348-52.

Probst FJ, Fridell RA, Raphael Y, Saunders TL, Wang A, Liang Y, Morell RJ, Touchman JW, Lyons RH, Noben-Trauth K, Friedman TB, and Camper SA (1998). Correction of deafness in shaker-2 mice by an unconventional myosin in a BAC transgene. *Science* 280, 1444–7.

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick DK, Lawrence C, LaMantia A, McNamara JO, Williams SM (2001). *Neuroscience*. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland (MA).

Rabionet R, Gasparini P, Estivill X (2000). Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins. *Hum Mutat*. Sep;16(3):190-202. Review.

Roux I, Hosie S, Johnson SL, Bahloul A, Cayet N, Nouaille S, Kros CJ, Petit C, Safieddine S (2009). Myosin VI is required for the proper maturation and function of inner hair cell ribbon synapses. *Hum Mol Genet*. Dec 1;18(23):4615-28. Epub 2009 Sep 10.

Sakaguchi H, Tokita J, Naoz M, Bowen-Pope D, Gov NS, Kachar B (2008). Dynamic compartmentalization of protein tyrosine phosphatase receptor Q at the proximal end of stereocilia: implication of myosin VI-based transport. *Cell Motil Cytoskeleton* 65:528-538.

Salles FT, Merritt RC, Manor U, Dougherty GW, Sousa AD, Moore JE, Yengo CM, Dosé AC, Kachar B (2009). Myosin IIIa boosts elongation of stereocilia by transporting espin 1 to the plus ends of actin filaments. *Nat Cell Biol*. Apr; 11(4):443-50.

Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.

Sanggaard KM, Kjaer KW, Eiberg H, Nürnberg G, Nürnberg P, Hoffman K, Jensen H, Sørup C, Rendtorff ND, Tranebjaerg L (2008). A novel nonsense mutation in MYO6 is associated with progressive nonsyndromic hearing loss in a Danish DFNA22 family. *Am J Med Genet A*. Apr 15;146A (8):1017-25.

Schliwa M, Woehlke G (2003). Molecular motors. *Nature*. Apr 17;422(6933):759-65. Review.

Schneider ME, Dose AC, Salles FT, Chang W, Erickson FL (2006). A new compartment at stereocilia tips defined by spatial and temporal patterns of myosin IIIa expression. *J Neurosci* 26:10243–10252.

Schraders M, Oostrik J, Huygen PL, Strom TM, van Wijk E, Kunst HP, Hoefsloot LH, Cremers CW, Admiraal RJ, Kremer H (2010). Mutations in PTPRQ are a cause of autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB84 and associated with vestibular dysfunction. *Am J Hum Genet* 86:604–610.

Schwander M, Kachar B, Müller U (2010). Review series: The cell biology of hearing. *J Cell Biol.* Jul 12;190(1):9-20. Review.

Seifert RA, Coats SA, Oganessian A, Wright MB, Dishmon M, Booth CJ, Johnson RJ, Alpers CE, and Bowen-Pope, DF (2003). PTPRQ is a novel phosphatidylinositol phosphatase that can be expressed as a cytoplasmic protein or as a subcellularly localized receptor-like protein. *Exp. Cell Res.* 287, 374–386.

Seiler C, Ben-David O, Sidi S, Hendrich O, Rusch A, Burnside B, Avraham KB, Nicolson T (2004). Myosin VI is required for structural integrity of the apical surface of sensory hair cells in zebrafish. *Dev. Biol.*;272:328-338.

Self T, Sobe T, Copeland NG, Jenkins NA, Avraham KB, Steel KP (1999). Role of myosin VI in the differentiation of cochlear hair cells. *Dev. Biol.* 214:331-341.

Sellers JR. (2000). Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta* 1496: 3-22.

Seri M, Cusano R, Gangarossa S, Caridi G, Bordo D, Lo Nigro C, Ghiggeri GM, Ravazzolo R, Savino M, Del Vecchio M, d'Apolito M, Iolascon A, Zelante LL, Savoia A, Balduini CL, Noris P, Magrini U, Belletti S, Heath KE, Babcock M, Glucksman MJ, Aliprandis E, Bizzaro N, Desnick RJ, Martignetti JA (2000). Mutations in MYH9 result in the May-Hegglin anomaly, and Fechtner and Sebastian syndromes. The May-Hegglin/Fechtner Syndrome Consortium. *Nat Genet.* 26: 103-5.

Shahin H, Rahil M, Rayan AA, Avraham KB, King MC, Kanaan M, Walsh T (2010). Nonsense mutation of the stereociliar membrane protein gene PTPRQ in human hearing loss DFNB84. *J Med Genet.*

Smith RJ, Bale JF Jr and White KR (2005). Sensorineural hearing loss in children. *Lancet* 5-11;365(9462),879-90.

The Hereditary Hearing loss Homepage - <http://hereditaryhearingloss.org/>

Thompson RF and Langford GM (2002). Myosin superfamily evolutionary history. *Anat Rec* 268(3), 276–89.

Titus MA (1998). Coming to grips with a multitude of myosins. *Trends Cell Biol* 8:171– 172.

Tlili A, Charfedine I, Lahmar I, Benzina Z, Mohamed BA, Weil D, Idriss N, Drira M, Masmoudi S, Ayadi H (2005). Identification of a novel frameshift mutation in the DFNB31/WHRN gene in a Tunisian consanguineous family with hereditary non-syndromic recessive hearing loss. *Hum Mutat.* May;25(5):503.

Toriello HV, Reardon W, Gorlin RJ (2004). *Hereditary Hearing Loss and Its Syndromes* (2nd edition), Oxford University Press.

Van Camp G, Willems PJ and Smith RJ (1997). Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity. *Am. J. Hum. Genet* 60(4):758-764.

van Wijk E, van der Zwaag B, Peters T, Zimmermann U, Te Brinke H, Kersten FF, Märker T, Aller E, Hoefsloot LH, Cremers CW, Cremers FP, Wolfrum U, Knipper M, Roepman R, Kremer H (2006). The DFNB31 gene product whirlin connects to the Usher protein network in the cochlea and retina by direct association with USH2A and VLGR1. *Hum Mol Genet.* Mar 1;15(5):751-65. Epub 2006 Jan 24.

Walsh T, Walsh V, Vreugde S, Hertzano R, Shahin H (2002). From flies' eyes to our ears: mutations in a human class III myosin cause progressive nonsyndromic hearing loss DFNB30. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7518–7523.

Walsh VL, Raviv D, Dror AA, Shahin H, Walsh T, Kanaan MN, Avraham KB, King MC (2011). A mouse model for human hearing loss DFNB30 due to loss of function of myosin IIIA. *Mamm Genome.* Apr;22(3-4):170-7. Epub 2010 Dec 17.

Wang A, Liang Y, Fridell RA, Probst FJ, Wilcox ER, Touchman JW, Morton CC, Morell RJ, Noben-Trauth K, Camper SA, Friedman TB (1998). Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. *Science.* 280:1447-51

Wang L, Zou J, Shen Z, Song E, Yang J (2012). Whirlin interacts with espin and modulates its actin-regulatory function: an insight into the mechanism of Usher syndrome type II. *Hum Mol Genet.* Feb 1;21(3):692-710. Epub 2011 Nov 2.

Weber KL, Sokac AM, Berg JS, Cheney RE, Bement WM (2004). A microtubule-binding myosin required for nuclear anchoring and spindle assembly. *Nature.* Sep 16;431(7006):325-9.

Wildeman M, van Ophuizen E, den Dunnen JT, Taschner PE (2008). Improving sequence variant descriptions in mutation databases and literature using the MUTALYZER sequence variation nomenclature checker. *Hum Mutat* 29:6-13

Winata S, Arhya IN, Moeljopawiro S, Hinnant JT, Liang Y, Friedman TB, Asher JH Jr (1995). Congenital non-syndromal autosomal recessive deafness in Bengkala, an isolated Balinese village. *J Med Genet.* May;32(5):336-43.

World Health Organization (WHO), 2006 <http://www.who.int/en/95>).

Wright RN, Hong DH, Perkins B (2012). RpgORF15 connects to the usher protein network through direct interactions with multiple whirlin isoforms. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Mar 21;53(3):1519-29.

Yang J, Liu X, Zhao Y, Adamian M, Pawlyk B, Sun X, McMillan DR, Liberman MC, Li T (2010). Ablation of whirlin long isoform disrupts the USH2 protein complex and causes vision and hearing loss. *PLoS Genet.* May 20;6(5):e1000955.

Yin H, Pruyne D, Huffaker TC, and Bretscher A (2000). Myosin V orientates the mitotic spindle in yeast. *Nature* 406, 1013–1015.



### **Artículos firmados por el doctorando, derivados de este trabajo de Tesis**

**Serrao de Castro L**, Santos SEB, Santana da Silva L, Monteiro D, Moreno F, del Castillo I.

A novel mutation in the *MYO15A* gene in a large Brazilian pedigree. Manuscrito en preparación.

**Serrao de Castro L**, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, Moreno F, del Castillo I.

Molecular screening of the *MYO15A* gene in multiplex and simplex Spanish cases of autosomal recessive non-syndromic hearing impairment reveals fourteen novel mutant alleles. Manuscrito en preparación.

**Serrao de Castro L**, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, Moreno F, del Castillo I.

Molecular characterization of a novel mutation in the *PTPRQ* gene in a Spanish Gypsy family segregating autosomal recessive non-syndromic hearing impairment. Manuscrito en preparación.